

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

THESIS

MARBURG

1966

**Die Beeinflussung
der TPNH-abhängigen Uracil- und
Thyminreduktasen der Leber
durch wachstumsinduzierende Pharmaka**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hans-Jürgen Kirchberg

aus Erfurt

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Die Beeinflussung
der TPNH-abhängigen Uracil- und
Thyminreduktasen der Leber
durch wachstumsinduzierende Pharmaka**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hans-Jürgen Kirchberg
aus Erfurt

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 13.12.1966

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.med.,Dr.med.dent.habil. H. Heuser

Referent: Doz.Dr.med. H.W. Kunz

Correferent: Prof.Dr.med. W. Schmid

Gliederung

- - - - -

A Einleitung

B Methodik

1. Tiermaterial und Tierhaltung
2. Präparate und Applikationsweise
3. Gewebeentnahme und Weiterverarbeitung
4. Warburg-Methode
5. Analyse der Zellbausteine
6. Scintillationsmethode

Statistische Berechnung

C Experimenteller Teil

I. Die Aktivität der Thymin- und Uracilreduktase in der Normalleber

- 1) Charakterisierung der Enzyme
- 2) Enzymaktivität und physiologische Schwankungsbreite

II. Beeinflussung des reduktiven Thymin- und Uracilabbaus in Leberschnitten durch Pharmaka

- 1) Barbitale
- 2) Chlorkohlenwasserstoffe
- 3) Verschiedene Pharmaka
- 4) Verschiedene Phenobarbitaldosen

III. Versuche zur Analyse der Reduktasehemmung

- 1) In vitro-Zusatz der Pharmaka
- 2) Versuche in Leberhomogenat und Zytoplasma
- 3) Kinetik der Enzymhemmung

IV. Zellphysiologische Bedeutung der Reduktasehemmung

- 1) Beeinflussung des Glucose-6-Phosphat-Shunts
- 2) C^{14} Incorporation aus markierter Glucose in Zellbausteine
- 3) Incorporation von Thymin- und Uracil- $2-C^{14}$ in Zellbausteine

D Diskussion

E Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Tabellenanhang



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A) Einleitung

Die chronische Zufuhr zahlreicher Pharmaka mit sehr unterschiedlichen chemischen und biologischen Eigenschaften führt bei der weißen Maus zu einer starken Vergrößerung der Leber. Die Gewichtszunahme geht ohne sichere morphologische Zeichen pathologischer Veränderungen, wie z.B. Nekrosen, Verfettung oder Ödemen einher. Da eine dem Gewichtsanstieg nahezu parallel laufende Vermehrung der wesentlichen Zellbausteine, der Proteine, freien Nucleotide, Nucleinsäuren und Phosphorlipide nachgewiesen werden konnte, darf als gesichert gelten, daß die Lebervergrößerung durch echtes Organwachstum bedingt ist (Dissertation RÄKER). Damit war hier wegen der Überschaubarkeit der initialen Vorgänge ein methodisch günstiges Modell für die Analyse von Zellwachstum, Zellvermehrung und der dabei wirksamen Regulationsmechanismen gegeben. Alle wachstumsauslösenden Pharmaka werden in der Leber metabolisiert und führen dabei zu einer erheblichen Beschleunigung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes. Es kommt etwa der Stärke der Wachstumsinduktion parallel laufend, zur Positivierung der Redoxlage des TPN-Systems (Dissertation BOSCH). Aus dem sehr frühen Auftreten dieser Veränderungen war zu vermuten, daß es sich hier nicht um eine Folge des Zellwachstums, sondern um initiale Veränderungen handelt.

Bei der zentralen Bedeutung des TPN-Systems für zahlreiche Stoffsynthesen der Zellen (KLINGENBERG und Th. BÜCHER) ist eine Regulation von Zellwachstum und Zellvermehrung durch TPN abhängige Mechanismen durchaus denkbar. Von HOLZER und WITT sind

am Beispiel der Hefe Hinweise für das Bestehen einer Steuerung von Protein- und Nucleinsäuresynthese über das TPN-System erbracht worden. Sie konnten zeigen, daß durch die TPNH verbrauchende Glutaminsäuresynthese über die Bereitstellung von TPN die Pentose-phosphat-Synthese aktiviert und damit die stoffliche Voraussetzung der Nucleinsäuresynthese gebildet wird.

CANELLACIS und Mitarbeiter fanden einen gleichsinnig wirkenden Mechanismus in Leberzellen. Sie wiesen nach, daß die Incorporation von Thymin und Uracil in Nucleinsäuren nur dann erfolgt, wenn die katabolen Enzyme Thymin- und Uracilreduktase entweder mit Substrat voll gesättigt oder in ihrer Aktivität vermindert sind. Das ist in der Ruhezelle nicht der Fall. In einer regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie ist die Aktivität beider Reduktasen dem Wachstumsindex parallel laufend herabgesetzt. In Hepatomen und Leberkarzinomen ist sie dem Malignitätsgrad entsprechend bis zum völligen Fehlen vermindert.

Aus den Untersuchungen wird geschlossen, dass beide Reduktasen sehr wesentliche Glieder eines Rückkopplungsmechanismus sind, der die Nucleinsäuresynthese über den Nucleotid-Pool steuert.

Die ausgeführten Arbeiten beschränkten sich auf die Darstellung der Aktivitätsgrößen, Untersuchungen über die Ursache der oft sehr schnell erfolgenden Aktivitätsschwankungen wurden nicht durchgeführt. Einige Daten, wie die Angabe ausgeprägter tagesrhythmischer Schwankungen, liessen vermuten, dass es sich nicht um eine Änderung der Enzymaktivität, sondern um Änderungen der Cofermentkonzentrationen handelt, die den gleichen rhythmischen Verlauf aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die sehr ausgeprägten Veränderungen der TPNH-Gehalte durch Applikation wachstumsinduzierender Pharmaka die Aktivität dieser beiden Enzyme beeinflussen, und ob diese Wirkung möglicherweise ein weiteres Glied der zum Wachstum führenden Kausalkette darstellt. Da in der Literatur die Enzymeigenschaften noch nicht näher charakterisiert wurden, mußten zunächst Grundlagenuntersuchungen über Kinetik und physiologische Aktivitätsbereiche durchgeführt werden.

B Methodik

1.) Tiermaterial und Tierhaltung

Alle Versuche wurden mit männlichen Albinomäusen aus der Zucht Z2 der Bundesforschungsanstalt Tübingen und der Zuchtanstalt Kisslegg/Allgäu gemacht. Das Gewicht der Mäuse bewegte sich zwischen ca. 20 und 34 Gramm. Sie wurden in Gruppen von 10-20 Tieren in Makrolonkäfigen gehalten. Die Tiere wurden mit Trockenfutter der Firma Iatz ernährt und erhielten Leitungswasser aus Saugflaschen.

2.) Präparate und Applikationsweise

Bei den meisten Versuchen wurden die Substanzen mit dem täglichen Trinkwasser gegeben. Die durchschnittliche Trinkmenge betrug 5ml pro Tag und Tier. Die Lösungen wurden täglich neu angesetzt. Die Barbitursäurederivate sind als Natriumsalze verabfolgt worden. Bei einem kleinen Teil der Versuche wurden den Tieren entsprechende Mengen der Pharmaka subkutan bzw. intraperitoneal injiziert, um exaktere Zeitverhältnisse zu erhalten.

Im einzelnen handelte es sich um folgende Substanzen :

- | | |
|--|---------------|
| 1.) Phenobarbital (Luminal ^(R)) | 20-200mg/kg |
| 2.) N-Methyl-äthyl-phenyl-barbital
(Prominal ^(R)) | 200mg/kg |
| 3.) Pentobarbital | 200mg/kg |
| 4.) Cyclobarbital (Phanodorm ^(R)) | 200mg/kg |
| 5.) Eunarcon ^(R) | 200mg/kg |
| 6.) Barbital (Veronal ^(R)) | 200mg/kg |
| 7.) Hexobarbital (Evipan ^(R)) | 150mg/kg |
| 8.) DDT | 1.p. 34 mg/kg |
| 9.) Halothan | 0,5% 1 Std. |
| 10.) Aldrin | 15mg/kg |
| 11.) Biotin | 1.p. 2mg/kg |
| 12.) Tyrosin-Tryptophan | 25 g/kg |
| 13.) Diäthylnitrosamin | 3,5mg/kg |

14.) Coramin (Nikethamid)

200mg/kg

3.) Gewebeentnahme und Aufbereitung

Die Tiere wurden gewogen und mittels Scherenschlages getötet. Wir verzichteten auf eine Ätherbetäubung, um eine Blutstauung in der Leber zu vermeiden. Nach vollständiger Entblutung wurde die Leber herauspräpariert, gewogen und in eisgekühlte Tyrode-Lösung gelegt. Mit einer scharfen Rasierklinge zerteilten wir den großen Leberlappen auf Tyrode-getränktem Fließpapier in feinste Schnitte (Grenzchnitte). Jeweils ca. 100mg dieses so aufbereiteten Lebergewebes kamen in ein Warburggefäß. Zur Fraktionierung von Plasma und Mikrosomen erfolgte die Präparation in der Kälte. Die Leber wurde mit der fünffachen Menge Saccharoselösung (0.25molar) im Potter homogenisiert (5mal L-(loose)- und 10mal T-(taft)-)

Saccharoselösung zur Fraktionierung:

Saccharose pro inj.	85.5g = 0,25 molar
Äthylendiamintetraacetat-EDTA	3,7g = 0,01 molar
Nikotinsäureamid DAB6	12,2g = 0,1 molar

in 1000 ml aqua dest. gelöst

plus einige Tropfen NaOH zur Neutralisation des EDTA

Das Homogenat wurde 15 Minuten lang bei 10 000 g zentrifugiert. Der Rückstand, der im wesentlichen Kerne und Mitochondrien enthielt, wurde verworfen, während wir mit dem Überstand (Plasma und Mikrosomen) einen Teil der Versuche machten. In anderen Experimenten wurden Plasma und Mikrosomen getrennt untersucht. Zu diesem Zwecke zentrifugierten wir den 10 000g-Überstand noch einmal eine Stunde lang in der Ultrazentrifuge bei 100 000g. Der Rückstand enthält die Mikrosomen, der

Überstand besteht aus dem Plasma.

4.) Warburg-Methode

a) Versuchsansätze

Thymin und Uracil

Die eisgekühlten Warburggefäße wurden wie folgt beschickt :

1.) 1,8 ml Tyrodelösung

2.) 0,1 ml unmarkiertes Thymin oder Uracil

Das entspricht $5 \mu\text{Mol/Ansatz}$, da 0,1 ml der Lösung 630γ Thymin bzw. 560γ Uracil enthielten, in $1 \mu\text{ Mol}$ aber 126γ Thymin bzw. 112γ Uracil gelöst waren.

In den Substratwirkungsversuchen wurde dieser Zusatz variiert. Die Werte lagen zwischen 0,3 und $10 \mu\text{Mol/Ansatz}$.

3.) 0,1 ml Thymin- bzw. Uracil-2- C^{14}

Bei Herstellung der Lösung wurden jeweils 0.05mC in 10 ml aqua dest. gelöst, so daß in den zugesetzten 0,1 ml $0,5 \mu\text{ C}$ Aktivität enthalten waren. Die spezifische Aktivität betrug somit $0,1 \mu\text{ C/l } \mu\text{ Mol}$.

4.) 100 mg der Leberschnitte

5.) 0,2 ml Hyamin-Hydroxyd zur Beschickung der Innengefäße, um das während des Versuches gebildete CO_2 zu absorbieren.

6.) 0,2 ml 3,3 n Perchlorsäure in den Kamin des Warburggefäßes, um den Versuch zeitlich exakt abbrechen zu können.

7.) Bei den in vitro-Versuchen wurden noch die jeweiligen Pharmaka hinzugefügt.

Homogenat

1.) MgCl (1molar)	10%	0,1 ml
2.) ATP	1%	0,1 ml

- | | | | |
|------|--|-------------------------------|----------------------|
| 3.) | Glucose | 2% | 0,1 ml |
| 4.) | TPN | 1% | 0,1 ml |
| 5.) | Glucose-6-Phosphat | 1% | 0,1 ml |
| 6.) | Phosphatpuffer | pH 7,4 | 0,2 ml |
| 7.) | Thymin bzw. Uracil | | 0,1 ml (5μ Mol) |
| 8.) | Thymin-bzw. Uracil-2- C^{14} | | 0,1 ml ($0,5\mu$ C) |
| 9.) | 10 000g-Überstand bzw. Plasma | | 1,0 ml |
| 10.) | Hexokinase | 1:1-Verdünnung mit aqua dest. | 0,005 ml |
| 11.) | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase | | |
| | 1:1-Verdünnung mit aqua dest. | | 0,005 ml |
| 12.) | 0,2 ml Hyamin-Hydroxyd für die Innengefäße | | |
| 13.) | 0,2 ml 3,3 n Perchlorsäure für die Kamine | | |

Glucose

Die Beschickung der Warburggefäße bei den Versuchen mit markierter Glucose erfolgte analog der bei den Experimenten mit Thymin und Uracil. Nur wurden statt der Pyrimidinbasen je 0,1 ml Glucose-1- C^{14} bzw. Glucose-6- C^{14} zugegeben. Die Aktivität betrug hier ebenfalls $0,5\mu$ C/Ansatz. Die unmarkierte Glucose war bereits in der Tyrodelösung enthalten. In den zugesetzten 1,9 ml Tyrode befanden sich 5,7 mg Glucose. Das entspricht bei einem Molekulargewicht von 180 $31,7\mu$ Mol/Ansatz. Bei den Versuchen mit Leberhomogenaten wurde hier das Glucose-6-Phosphat weggelassen. An unmarkierter Glucose waren ja, wie beschrieben, 0,1 ml 2%iger Glucose zugesetzt worden, was 2 mg oder $10,1\mu$ Mol entspricht.

b) Der Versuchsablauf im Warburgapparat

Die unter 4a. beschriebenen, beschickten Warburggefäße wurden an die Manometer angeschlossen und in das auf 37 Grad Celcius erwärmte Wasserbad der

Warburgapparatur gehängt. Unter ständigem Schütteln beatmeten wir die Töpfe mit den Leberschnitten mittels einer Sauerstoffflasche 10 Minuten lang mit Sauerstoff. Anschließend wurde das System luftdicht abgeschlossen und der rechte Manometerschenkel auf 150 als festem Bezugspunkt eingestellt. Unter ständigem Schütteln der Gefäße lasen wir auf dem linken Schenkel alle 10 Minuten während der einstündigen Versuchsdauer den Sauerstoffverbrauch des atmenden Lebergewebes ab. Dabei wurde jedesmal der rechte Schenkel wieder auf 150 heruntergestellt, da nach der Formel $D \times V \times T = K$ auch der Druck immer konstant gehalten werden muß. Nach einer Stunde brachen wir den Versuch durch die Perchlorsäure im Kamin des Warburggefäßes ab. Jedes Innengefäß mit Hyamin-Hydroxyd wurde zur Messung des absorbierten $C^{14}O_2$ in einen Topf mit Scintillationsflüssigkeit gegeben.

Die Gefäße mit Homogenat und komplettiertem System wurden ohne Beatmung 5 Minuten lang zur Temperaturengleichung im Warburgapparat geschüttelt. Anschließend wurde ebenfalls alle 10 Minuten der Sauerstoffverbrauch abgelesen. Diese Versuche brachen wir schon nach einer halben Stunde ab.

5.) Prüfung der Incorporation markierter Substanzen und ihrer Metabolite in Zellbausteine

a) Perchlorsäureextraktion

Nach Beendigung des Versuches und Entfernung der Innentöpfe wurde der Inhalt der Warburggefäße unter Nachspülung mit je 2 ml 0,33n kalter Perchlorsäure in gekühlte Zentrifugengläser gegeben und auf dem Magnetrührer 5 Minuten lang in der Kälte extrahiert. Dann zentrifugierten wir diesen Extrakt 5 Minuten bei 3000 U. und neutralisierten den Überstand mit 3,2n KOH.

Nach Absetzen des Niederschlages in der Kälte konnte dekantiert werden. Wir lösten je 0,2 ml dieses Extraktes in 5 ml Methanol und bestimmten die Restaktivität von Glucose bzw. Pyrimidinbasen mit 10 ml Toluol 1 im Scintillationszähler.

b) Papierchromatographische Bestimmung der Substanzen des Perchlorsäureüberstandes

Die im Perchlorsäureüberstand enthaltenen Metabolite wie Lactat u.a. wurden teilweise auch papierchromatographisch aufgetrennt. Zu diesem Zweck tropften wir 2 ml des Extraktes auf und bestimmten anschliessend die Aktivität der einzelnen ausgeschnittenen Flecke im Scintillationszähler. Ausserdem wurde die UV-Absorption der aufgetrennten markierten Substanzen geprüft.

c) Alkoholfällung des Perchlorsäureextraktes

Um die alkoholfällbare Fraktion des Extraktes, die hauptsächlich freie Nucleotide und Lyoglykogen bei den Versuchen mit Glucose enthält, zu erfassen, fällten wir 10 ml Perchlorsäureextrakt mit 30 ml Äthanol in der Kälte. Nach beendigter Fällung nach 24 Stunden wurde diese Fraktion unter zweimaligem Nachspülen der verwendeten Zentrifugengläser mit je 10 ml Äthanol mit einer Wasserstrahlpumpe auf Filterplättchen aufgenutscht. Die getrockneten Plättchen wurden mit 15 ml Toluol 2 in die Meßtöpfe zur Scintillationsmessung gegeben.

d) Lipoidextraktion

Der Rückstand nach Perchlorsäureextraktion wurde noch einmal mit 8 ml kalter 0,33 n HClO_4 auf dem Magnetrührer 5 Minuten lang in der Kälte extrahiert und anschließend bei 3000 U.zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Fettextraktion machten wir anfangs mit Äther-Äthanol(1:3), später wurde dann Chloroform-Methanol (2:1) verwandt. Der Rückstand wurde dreimal im Abstand von einer Stunde mit dem Extraktionsmittel 5 Minuten lang

auf dem Magnetprüher und anschließend eine Stunde im Wasserbad von 50 Grad C. extrahiert. Nach jeder Extraktion zentrifugierten wir den Extrakt 5 Minuten bei 3000 U. und sammelten die Überstände in einem Meßtopf, um sie dann im Vacuumexcikator einzudampfen. Der Rückstand wurde in 5 ml Methanol und 10 ml Toluol 1 gelöst und zur Messung seiner Aktivität in den Scintillationszähler gegeben.

e) Nucleinsäurebestimmung

Der nach Lipoidextraktion gewonnene Rückstand enthielt in der Hauptsache noch Nucleinsäuren und Protein. Um den Einbau in Nucleinsäuren zu prüfen, wurde dieser Rückstand in 4 ml TRA-Puffer auf dem Magnetprüher aufgewirbelt und anschließend mit 200 μ Ribonuclease (=0,2 ml) im Wasserbad von 37 Grad C. 2 Stunden lang inkubiert.

TRA-Puffer

pH 7,6 0,4 molar
18,6 g Triäthanolamin-hydrochlorid in 200 ml aqua bidest.
18 ml 2n NaOH
3,7 g EDTA-Na₂ H₂.2 H₂O ad 250 ml

Die so aufgeschlossene, im Puffer gelöste RNS trennten wir in der Zentrifuge bei 3000 U. vom Rückstand und gaben sie in einen Meßtopf. Der Rückstand wurde wieder mit 4 ml TRA-Puffer aufgewirbelt und mit 100 μ Desoxyribonuclease 12 Stunden lang bei 37 Grad C. inkubiert. Nach neuerlichem Zentrifugieren wurde der Überstand zur DNS-Bestimmung abgegossen.

Nach Eintrocknung der Überstände im Vacuumexcikator wurden die aus RNS bzw. DNS bestehenden Rückstände in 2 ml Hyamin, 3 ml Methanol und 10 ml Toluol 1 gelöst, um anschließend im Scintillationszähler gemessen zu werden.

f) Proteinbestimmung

Nach Durchführung aller Extraktionsverfahren besteht der noch vorhandene Rückstand in der Hauptsache noch aus Protein. Er wurde, um die Aktivität der incorporierten Substanzen zu messen, auf dem Magnetrührer in 2 ml Hyamin, 3 ml Methanol und 10 ml Toluol 1 gelöst, und anschliessend in den Scintillationszähler gegeben.

6) Scintillationsmethode

Die Zählung der radioaktiven Impulse erfolgte im Flüssigkeitsscintillationszähler der Firma Nuclear Chicago. Als Scintillationsflüssigkeit diente Liquifluor der gleichen Firma. Das 25fache Konzentrat enthält 50g PPO und 0,625 g POPOP pro 500 ml. Wir gaben 42 ml davon in 1000 ml Toluol, so daß im Liter 4 g PPO und 50 mg POPOP enthalten waren. Diese Verdünnung ist in der vorliegenden Arbeit als Toluol 2 bezeichnet worden. Wenn ein Drittel des Flüssigkeitsvolumens durch Lösungsmittel eingenommen wurden, wählten wir entsprechend eine andere Verdünnung, bei der 63 ml Liquifluor auf 1000 ml Toluol gegeben wurden (Toluol 1). Die Endkonzentration im Meßansatz betrug demnach bei beiden Verdünnungen 0,4% POPOP und 0,005% PPO. Zur Ermittlung der absoluten Aktivitäten wurde die Quench - Korrektur mit Hilfe der Kanalverhältnismethode vorgenommen. Mit Hilfe eines C^{14} -Standardpräparates wurde als Optimaleinstellung folgendes Verhältnis ermittelt. Minimalspannung DATA 1000 Volt
Maximalspannung GATE 1300 Volt
In Kanal 1 ist die Gesamtaktivität $L_1 - \infty$, in Kanal 2 L_3-L_5 und in Kanal 3 L_3-L_4 gemessen worden.
Die Diskriminatoreinstellung betrug für L_1 und $L_3=0,5$, für $L_4=1,9$ und für $L_5=9,9$. Die Beziehung von Kanalverhältnis und Effektivität wurde dazu unter Verwendung einer Testreihe mit

gleicher Aktivität und ansteigendem Quencheffekt ermittelt. Die Ausbeute des ungequenchten Standard betrug 83%. Die Quenchkurve fiel dann bis zum Kanalverhältnis von 0,9 nahezu linear ab. Von 0,9-0,99 sank die Ausbeute wesentlich steiler ab. Bei den Analysen betrug das Kanalverhältnis ca. 0,45 = 80% Effektivität bei der Bestimmung von CO_2 , bei den freien Nucleotiden 0,85 = 54 - 55%, bei Lyoglykogen 0,62 = 68 - 71% und bei Lipoiden, RNS, DNS und Protein 0,9 - 0,99 = 10-50% Ausbeute.

Statistische Berechnung

Zur Beurteilung der Fehlerbreite wurde die mittlere Abweichung der Einzelwerte σ_E und der Mittelwerte σ_m berechnet. Die statistische Signifikanz ermittelten wir auf Grund der t-Verteilung. Als Sicherheitsgrenze wurde $p=0,001$ festgelegt.

B) Experimenteller Teil

I. Die Aktivität der Thymin- und Uracilreduktase in der Normalleber

1) Versuche zur Charakterisierung der Enzyme

Die bisher besonders von CANELLACIS et al. durchgeführten Untersuchungen befaßten sich im wesentlichen mit der biologischen Bedeutung der Thymin- und Uracilreduktase. Es wurden keine exakten quantitativen Daten zur Charakterisierung der Enzymaktivitäten angegeben. - Die Analysen dieser Autoren waren ausserdem mit Schnitten und Homogenat von Rattenlebern gemacht worden. Es war deshalb zur Festlegung der Vergleichsgrundlagen zunächst einmal notwendig, eine Reihe von Grundlagenuntersuchungen über die Kinetik der Enzyme, über ihre Aktivität in der Normalleber der von uns verwendeten Mäuse, und über den physiologischen Variationsbereich der Aktivität durchzuführen.

a Untersuchung des Wirkungsverlaufs

Die Aktivität der beiden Enzyme wurde mit Hilfe der im methodischen Teil beschriebenen Verfahren (Seite 6) durch Inkubation von Leberschnitten und Homogenat in der Warburgapparatur ermittelt. Es wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Enzymaktivität geprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt. Die dort gezeigte Zeit-Wirkungskurve verläuft asymptotisch. Nach steilem Anstieg in den ersten Minuten vermindert sich die Aktivität und verläuft während der weiteren Versuchsdauer bis zu einer Stunde annähernd linear. Eine mathematische Gesetzmäßigkeit ließ sich aus diesem Verlauf nicht ableiten. Es scheinen hier mehrere Faktoren zusammenzuwirken. Wir ermittelten deshalb aus dem steilen Anstiegsschenkel die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und aus dem gesamten Kurvenverlauf während des einstündigen Versuches

Zeitlicher Verlauf der Uracilreduktion in Leberschnitten

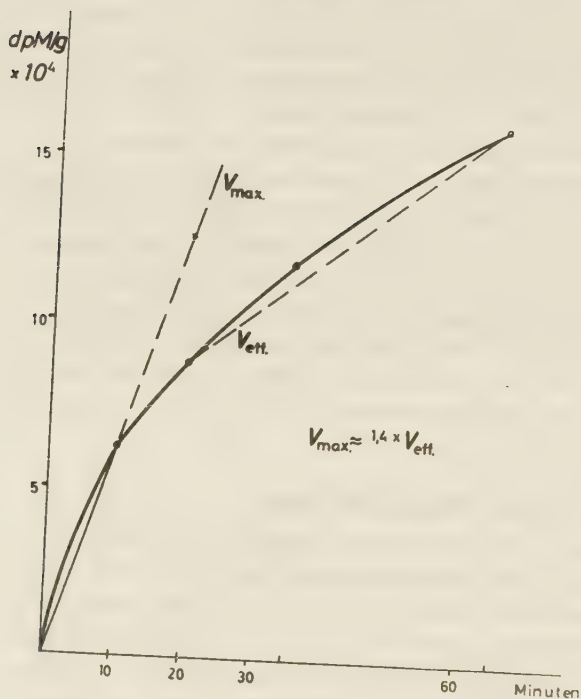


Abbildung 1

die effektiv gemessenen Werte. Aus methodischen Gründen ist immer eine Stunde lang untersucht worden. Die maximale und die effektive Geschwindigkeit unterscheiden sich durch einen Faktor von 1,4 - liegen also in der gleichen Größenordnung.

Im Vergleich mit den Aktivitäten anderer Fermente handelt

es sich auch bei Berücksichtigung der maximalen Anfangsgeschwindigkeit bei beiden Reduktasen um „kleine“ Enzyme. Die aus den Anfangsgeschwindigkeiten errechneten absoluten Aktivitäten sind zusammen mit denen anderer Enzyme in Internationalen Einheiten in Abbildung 2 angegeben.

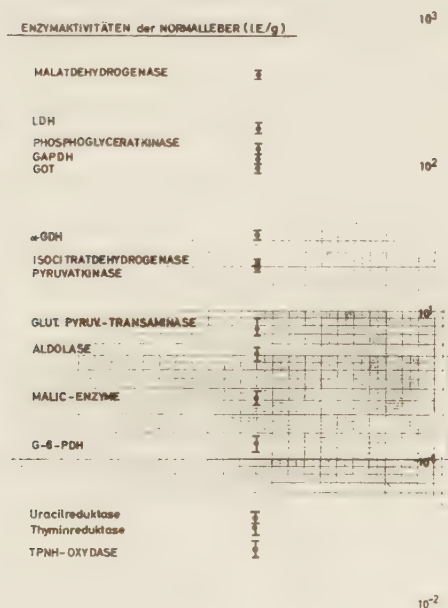


Abbildung 2

Sie liegen interessanterweise größenordnungsmäßig im Bereich der mikrosomalen TPNH-Oxydase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Diese annähernde Übereinstimmung ist von Bedeutung für die Beurteilung der späteren Versuchsergebnisse. Sie läßt bei Berücksichtigung des zytoplasmatischen TPN-Pools die einleitend diskutierten Mechanismen zumindest quantitativ möglich erscheinen.

b Ermittlung der Substratwirkungsbeziehungen

Die Fragestellung unserer Versuche erforderte ein Arbeiten im Bereich der maximalen Substratsättigung. Von beiden Enzymen wurden deshalb Substratwirkungsbeziehungen unter den später angewandten Versuchsbedingungen an Leberschnitten bei einstündiger Inku-

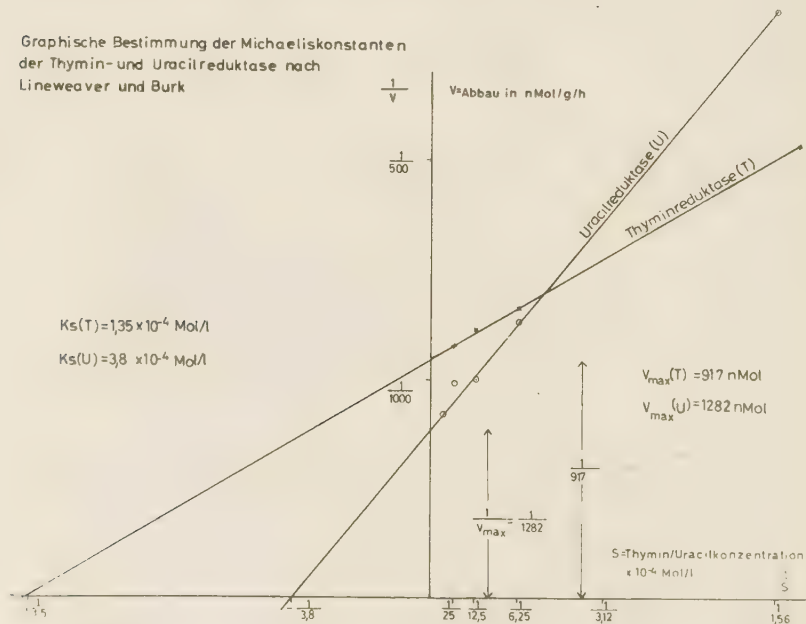


Abbildung 3

bation geprüft. In Abbildung 3 ist der Verlauf der Substratwirkung nach LINEWAEVER und BURK dargestellt. Beide Enzyme besitzen mit einer Michaeliskonstanten von $1,35 \text{ mal } 10^{-4} \text{ Mol/l}$ für Thymin und $3,8 \text{ mal } 10^{-4} \text{ Mol/l}$ für Uracil eine vergleichsweise hohe Substrataffinität. Die Substratsättigungsgeschwindigkeit V_{max} liegt für die Thyminreduktase bei 917 nMol und für die Uracilreduktase bei 1282 nMol. Im zellfreien Homogenat liegt die Michaeliskonstante nur wenig niedriger. Für die Thyminreduktase wurde eine Halbwertsättigung von $0,45 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$ gemessen. Das ist das dreifache des im Ganzgewebe gefundenen Wertes. Die Werte liegen aber in der gleichen Größenordnung. Für die späteren Untersuchungen war ausschließlich die für eine Maximalaktivität erforderliche Substratkonzentration von Wichtigkeit. Wir setzten auf Grund der oben angegebenen Daten bei beiden Enzymen $5 \mu \text{ Mol}$ Substrat ein. Auch bei einstündiger Versuchsdauer war damit eine Substratlimitierung auszuschließen.

c pH-Abhängigkeit

Das pH-Optimum liegt in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von CANELLACIS an der Rattenleber für beide Enzyme im Neutralbereich. Bei einem pH-Wert von 5,5 war die Aktivität um mehr als die Hälfte erniedrigt. Das ist in Tabelle 1 am Beispiel der Thyminreduktase dargestellt worden.

Tabelle 1

pH-Abhängigkeit der Thyminreduktase

Thyminindosis	5	2,5	1,25	$\mu \text{ Mol}$
<u>pH 7,4</u>				
C^{14}O_2 -Bildung in dpM/g	193 267	359 107	664 528	
" in nMol/g/h	870	808	748	
<u>pH 5,5</u>				
C^{14}O_2 -Bildung in dpM/g	81 898	112 395	167 068	
" in nMol/g/h	369	254	188	

Die Aktivitätsherabsetzung im sauren Milieu geht bei beiden Enzymen mit einer quantitativ annähernd gleichen Erhöhung der Michaeliskonstanten einher. Sie beruht demnach auf der stärkeren Dissoziation des Enzym-Basen-Komplexes (Abbildung 4).

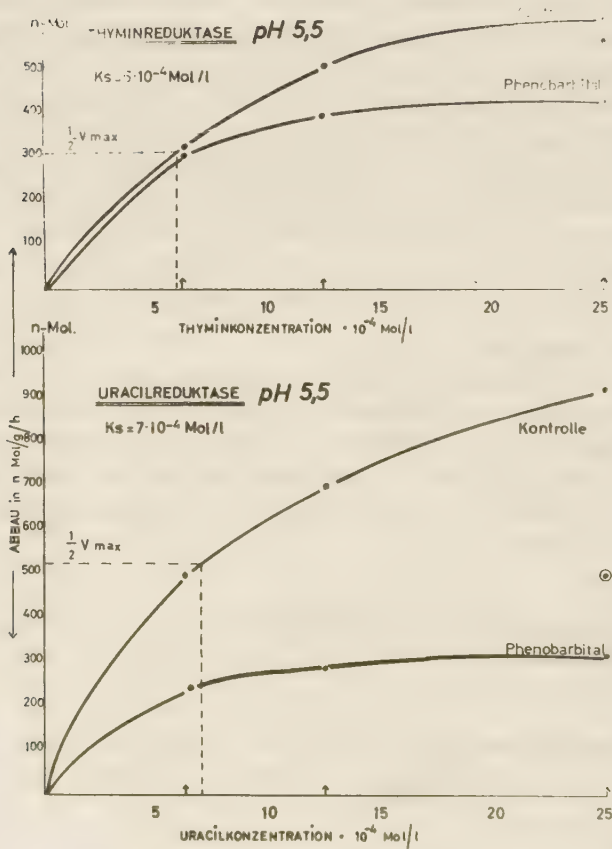


Abbildung 4 Dosiswirkungsverlauf und Michaeliskonstante bei pH 5,5

2) Enzymaktivität und physiologische Schwankungsbreite

Die bei der Untersuchung eines Kollektivs von 57 Tieren unter den beschriebenen Versuchsbedingungen erhaltenen Werte sind in Tabelle 2 angegeben. Es werden die gemessenen $C^{14}O_2$ - Mengen und die daraus errechneten molaren Substratmengen angegeben, die von 1g Leber in einer Stunde abgespalten wurden.

Tabelle 2

Die Aktivität der Thymin- und Uracilreduktase bei Normaltieren

1. Thyminreduktase

	n	dpM/g ($C^{14}O_2$)	σ	= nMol Thymin/g/Std.
1.Serie	21	131 651	9104	= 592
2.Serie	38	201 243	7595	= 906
Mittelwert	59	176 472		= 795

2. Uracilreduktase

	n	dpM/g ($C^{14}O_2$)	σ	= nMol Uracil/g/Std.
1. Serie	21	186 715	13 586	= 841
2. Serie	27	202 318	18 089	= 911
Mittelwert	48	195 491		= 880

Das Gewicht der Tiere schwankte zwischen 20 und 33g. Eine eindeutige Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Tiergröße bzw. dem Alter wurde in diesem Bereich nicht gefunden. Auch konnten wir im Gegensatz zu CANELLACIS, der bei Ratten tagesperiodische Schwankungen feststellte, eine solche Rhythmik bei Mäusen nicht erkennen. Dagegen besitzen sowohl die Thymin- als auch die Uracilreduktaseaktivität sicher eine Abhängigkeit vom Jahresrhythmus, und zwar in dem gleichen Sinne, wie sie für die TPN/TPNH-Gehalte der Leber (KUNZ) und die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GLOCK, MC LEANE) gefun-

den wurden.

Tabelle 3

Jahresrhythmische Schwankungen der Uracilreduktase-
aktivität

Monate	n	dpM/g(C ¹⁴ O ₂)
Februar	12	203 085
Mai	6	177 745
Juni	3	139 176
Juli	13	202 318
August	14	202 318
Oktober	4	224 651

II. Die Beeinflussung des reduktiven Thymin- und Ura-
cylabbaus in Leberschnitten durch Pharmaka

Für die Untersuchungen über die Beeinflussung der Thymin- und Uracilreduktion durch Pharmaka wurden Substanzen ausgewählt, bei denen Verlauf und Ausmaß der Wachstumsinduktion aus vorausgegangenen Versuchsreihen bekannt waren. Aus der Barbitalseihe wählten wir das stark das Leberwachstum induzierende Phenobarbital, das mittelstark induzierende Barbital, das unwirksame Hexobarbital, sowie bei je 2 - 3 orientierenden Versuchen Pentobarbital, Eunarcon und Phanodorm. Als Beispiele einiger die Mikrosomen nicht induzierender Pharmaka, die auch Leberwachstum auslösen, wurden die Chlorkohlenwasserstoffe Halothan, Chlorphenotan und Aldrin untersucht. Ferner prüften wir Coramin, Benzpyren und Dimethylnitrosamin, letzteres als Beispiel einer karzinogenen Substanz.

1) Beeinflussung der Thymin- und Uracilreduktase durch
Barbitale

Die in dieser Versuchsreihe gefundene Beeinflussung

der Thymin- und Uracilreduktaseaktivität, angegeben in Prozent der jeweiligen Kontrollen, sind in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. Die absoluten Daten und die statistische Beurteilung bringt Tabelle 4.

HEMMUNG DER THYMINREDUKTION DURCH BARBITALE IN LEBERSCHNITTEN

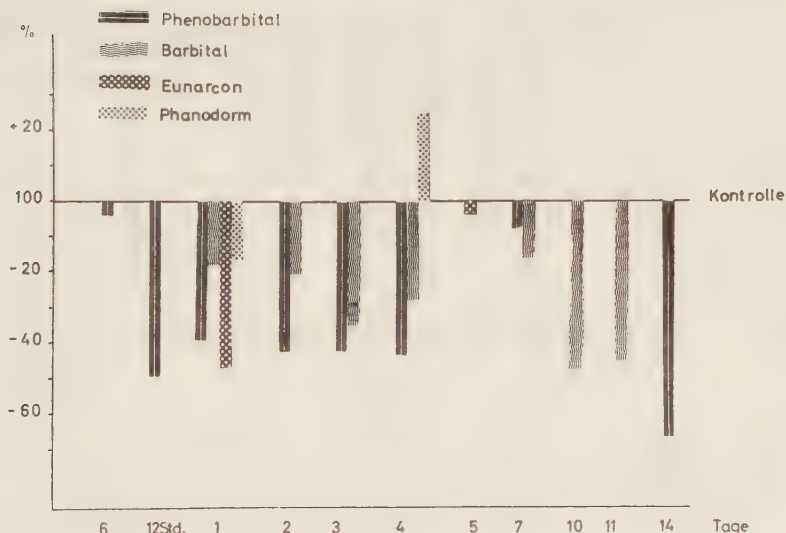


Abbildung 5

Aus den Säulendiagrammen geht deutlich hervor, daß die Aktivität beider Reduktasen durch die wachstumswirksamen Verbindungen herabgesetzt wird. Verlauf und Ausmaß der Hemmung entsprechen dabei annähernd der Wirksamkeit der Pharmaka auf die Lebervergrößerung. Bei Phenobarbital konnten wir schon 2 Stunden nach

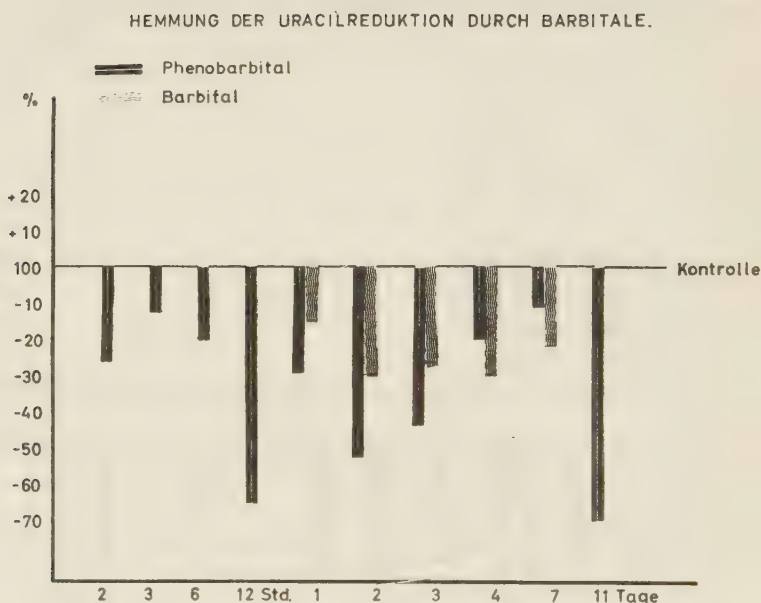


Abbildung 6

der Applikation eine Senkung des reduktiven Uracilabbaus beobachten. Die Hemmung ist nach 12 Stunden signifikant und bleibt während der Beobachtungsdauer von 14 Tagen statistisch sicher erhalten. Barbitol besitzt eine ebenfalls deutliche, jedoch wesentlich schwächere Wirkung als Phenobarbital. Hexobarbital war ohne klar erkennbaren Effekt. Die Beeinflussung der Thyminreduktion verläuft bei annähernd gleich starker Ausprägung ähnlich. Die Wirksamkeit der einzelnen Substanzen besitzt die gleiche Abstufung wie bei der Uracilreduktion. Um an einer größeren Reihe die hier augenscheinliche Parallelität von Wachstumswirkung und Hemmung der Basenreduktion zu prüfen, wurde die Wirksamkeit einiger

weitere Barbitale in Einzelversuchen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 5 und 6 aufgenommen.

Tabelle 4

Wirkung von Barbitalen auf die Thymin- und Uracilreduktion

a) Thyminreduktion

1. Substanz: Phenobarbital

Appl.dauer	n	relat.	C ¹⁴ O ₂ -Bildung				
			Lebergew.	dpM/g	σ	p	Δ %
<u>1. Serie</u>							
Kontrolle	38	51,1	201 243	8 734			
6 Stunden	3	54,6	189 919	22 421	-		- 5,7
12 "	3	47,5	100 365	20 232	0,001		-50,2
24 "	9	57,5	100 450	4916	0,001		-50,1
2 Tage	6	53,0	128 723	23 706	0,008		-36,1
3 "	3	92,1	115 598	16 132	0,001		-42,6
4 "	3	87,4	113 810	8 734	0,001		-43,5
7 "	3	85,0	185 319	6929	-		- 8,0
14 "	3	62,8	66 429	3 146	0,001		-67,0

2. Serie

Kontrolle	21	45,7	131 651	9 104			
1. Tag	6	61,6	91 959	6533	0,003		-30,2
2. Tage	3	80,1	67 462	7850	0,001		-48,8

2. Substanz : Barbital

1. Serie

Kontrolle	21	45,7	131 651	9 104			
1. Tag	6	50,2	108 620	10 260	-		-17,5
2. "	6	51,1	81 984	7 630	0,001		-37,8
3. "	6	59,6	96 875	11 810	0,03		-26,5
4. "	3	48,6	78 436	12 500	0,004		-40,5

2. Serie

Kontrolle	38	51,1	201 703	7 595			
2. Tag	8	52,5	159 991	11 460	-		-20,7

Appl.dauer	n	relat.	C ¹⁴ O ₂ -Bildung				
			Lebergew.	dpM/g	σ	μ	Δ%
3. Tag	6	53,5	109 934	8 313	0,001	-45,5	
4. "	8	57,5	166 918	8 757	-	-17,3	
7. "	2	81,2	167 753	18 672	-	-16,9	
10. "	6	70,2	103 817	5 122	0,001	-48,5	
11. "	6	71,0	108 272	6 569	0,001	-46,3	

3. Substanz: Eunarcon

Kontrolle	38	51,1	201 243	8 734			
1. Tag	3	41,0	106 347	21 950	0,001		-47,2
5. "	3	59,0	193 379	2 303	-		- 4,0

4. Substanz: Phanodorm

Kontrolle	38	51,1	201 243	8 734			
1. Tag	3	49,7	165 322	10 835	0,01		-17,9
4. "	3	53,6	252 101	17 395	0,01		+25,2

b) Uracilreduktion

1. Substanz: Phenobarbital

Kontrolle	27	51,1	202 243	18 089			
2 Stunden	6	55,8	147 249	18 010	-		-27,3
3 "	10	53,4	176 714	11 620	-		-12,7
6 "	11	54,6	162 089	15 280	-		-19,9
12 "	3	47,5	65 194	9 751	0,001		-67,8
1 Tag	3	57,5	134 209	8 797	0,006		-33,7
2 Tage	6	53,0	127 051	20 443	0,004		-37,3
3 "	6	92,1	110 045	10 045	0,001		-45,7
4 "	3	87,4	84 297	5 358	0,001		-58,4
7 "	3	85,0	180 079	13 101	-		-11,0
14 "	3	62,8	67 162	4 711	0,001		-66,9

Appl.dauer	n	relat.	C ¹⁴ O ₂ -Bildung				
			Lebergew.	dpM/g	δ	π	$\Delta\%$
<u>2. Serie Phenobarbital</u>							
Kontrolle	21	45,7	186 715	13 586			
1. Tag	6	61,6	135 050	11 094	0,008		-27,7
2. "	3	80,1	57 297	2 456	0,001		-69,4

2. Substanz: Barbitol

1. Serie

Kontrolle	21	45,7	186 715	13 586			
1. Tag	6	50,2	158 688	11 310	-		-15,1
2. "	6	51,1	131 096	17 250	0,01		-29,8
3. "	6	59,6	137 144	15 730	0,03		-26,6
4. "	3	48,6	120 371	21 440	0,01		-35,6

2. Serie

Kontrolle	27	51,1	202 318	18 089			
2. Tag	3	52,5	142 317	26 172	-		-29,7
4. "	3	57,5	154 701	8 554	0,05		-23,6
7. "	2	81,2	157 835	28 465	-		-22,0

2) Wirkung von Chlorkohlenwasserstoffen

Durch das eine starke Lebervergrößerung bewirkende Halothan wurde die Thyminreduktion in ähnlichem Ausmaße gehemmt wie durch Phenobarbital. Die Erniedrigung war vom 5.Tag an signifikant, und noch nach 28 Tagen sicher nachzuweisen. Dieser Verlauf entspricht vollständig den bei der Analyse der TPN-Redoxlage gemachten Beobachtungen. Aldrin erwies sich sogar bezüglich der Hemmung der Thyminreduktion als das stärkste aller untersuchten Pharmaka. Die genauen Daten der Wirkung von Halothan, Aldrin und des ebenfalls sehr stark wirksamen Chlorphenotan s.igt Tabelle 5.

Tabelle 5

Wirkung der Chlorkohlenwasserstoffe auf die Thyminreduktion

Appl.dauer	n	reat.	$C^{14}O_2$ -Bildung			
			Lebergew.	dpM/g	$\bar{G}$	$\bar{n}$
<u>1.Substanz: Aldrin</u>						
Kontrolle	38	51,1	201 243	7 595		
1 Tag	3	48,1	125 814	9 318	0,001	-37,5
2 Tage	3	49,9	81 508	11 305	0,001	-59,5
1 Woche	3	95,5	36 922	2 483	0,001	-81,7
<u>2.Substanz: DDT</u>						
Kontrolle	38	51,1	201 243	7 595		
3 Tage	3	55,1	82 740	11 255	0,001	-58,9
11 Tage	3	50,6	83 093	8 431	0,001	-58,8
<u>3. Substanz: Halothan</u>						
Kontrolle	38	51,1	201 243	7 595		
5 Tage	4		96 576			-52,0
6 Tage	6		114 684			-43,0
4 Wochen	28		120 464			-40,0

3) Die Wirkung verschiedener Pharmaka

Die karzinogene Substanz Dimethylnitrosamin sowie das ebenfalls untersuchte Benzpyren und Coramin zeigten keine Hemmung der Thyminreduktion (Tabelle 6)

Tabelle 6

Appl.dauer	n	relat.	$C^{14}O_2$ -Bildung			
			Lebergew.	dpM/g	$\bar{G}$	$\Delta\%$
Kontrolle	38	51,1	201 243	7 595		
Dimethylni- trosamin(19 Wochen)	8		245 464			+22,6
Benzpyren 11 Tage	3	55,4	174 249	6 083	0,01	-13,5
Coramin 1 Tag	3	42,7	180 023	9 318	-	-10,6
" 5 Tage	3	61,5	229 539	16 610	-	+14,0

4) Die Beeinflussung durch Applikation verschiedener Phenobarbitaldosen

Am Beispiel der Uracilreduktion wurde geprüft, ob eine gesetzmässige Abhängigkeit des Leberwachstums und der Aktivitätsminderung der beiden Reduktasen von der Applikation verschiedener Phenobarbitaldosen besteht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche Parallelität. Kleine Phenobarbitalgaben sind praktisch wirkungslos. Mit ansteigenden Pharmakadosen tritt eine zunehmende Hemmung der Uracilreduktion ein. Reduktasehemmung und Wachstumsszahlen stimmen deutlich überein.

Tabelle 7

Phenobarbitaldosis-Wirkungsabhängigkeit der Uracilreduktion

Applikationsdauer 3 Tage

Tgl.Dosis	Kontr.	20mg/kg	50	100	200
Rel.Lebergew.	51,1	52,9	62,2	67,6	68,6
Δ %		+3,5	+21,7	+32,2	+34,2
C ¹⁴ O ₂ in dpM/g	202 318	202 239	142 737	173 213	100 157
Δ %		-	-29,5	-14,4	-50,5

III) Versuche zur Analyse der Reduktasehemmung durch wachstumsinduzierende Pharmaka

Als Ursache der gehemmten Basenreduktion in intaktem Lebergewebe waren zu diskutieren :

1. Eine Reaktionslimitierung durch TPNH-Mangel

2. Eine direkte Enzyminhibition
3. Eine Substratlimitierung als Folge einer Hemmung der Substratpermeation durch die applizierten Pharmaka
4. Eine quantitative Verminderung der Enzymgehalte als Folge der Wachstumsauslösung.

Zur Aufklärung der Hemmungsmechanismen wurde in der folgenden Versuchsreihe geprüft, ob die in intaktem Gewebe beobachteten Veränderungen auch in Homogenaten und Zytoplasma auftreten, und gegebenenfalls durch Zugabe von TPN und einem TPNH-regenerierenden System, das eine Limitierung von TPNH ausschließt, aufgehoben werden können. Die Frage der direkten Enzyminhibition wurde durch in vitro-Zusatz der wirksamen Pharmaka untersucht. Zusätzlich versuchten wir durch kinetische Analysen Hinweise auf den Charakter der Hemmung zu erhalten.

1) Beeinflussung der Thymin- und Uracilreduktion durch Zusatz der Pharmaka in vitro

Bei Inkubation von Schnitten mit Phenobarbital in der den in vivo-Dosen entsprechenden Konzentration von 100 mg/ml wurde der reduktive Abbau beider Basen praktisch nicht beeinflusst. Direkte Enzymhemmung und Wirkung auf die Permeation waren dadurch auszuschließen.

Durch Hexobarbital, das bei in vivo-Zusätzen kaum wirksam war, wurde die Thyminreduktion dagegen signifikant und dosisabhängig gehemmt (Abbildung 7).

Es finden sich also die gleichen Verhältnisse, die sich bei den Untersuchungen über die Erhöhung des

TPN-Umsatzes gezeigt hatten. Hier wirkte Hexobarbital *in vivo* nur kurz, besaß dagegen bei Zusatz *in vitro* eine starke, von der Dosis abhängige Aktivitätssteigerung.

Hemmung des reduktiven Thymin- und Uracilabbaus
in Leberschnitten durch in-vitro-Einwirkung von Hexobarbital.

Abspaltung von $C^{14}O_2$
aus Thymin-2- C^{14} (5,0 μ Mol.)

Abspaltung von $C^{14}O_2$
aus Uracil-2- C^{14} (50 μ Mol.)

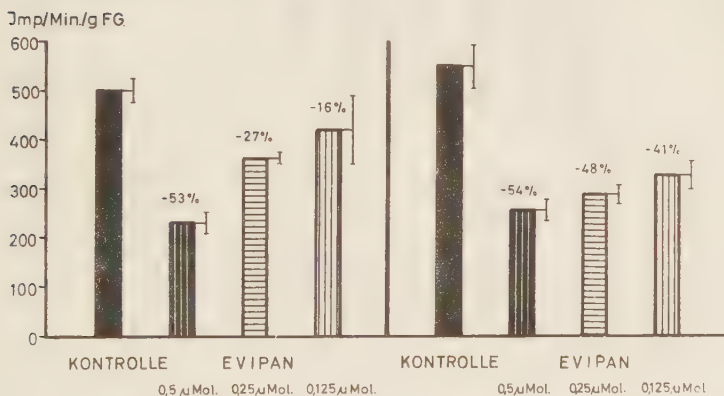


Abbildung 7

Danach war es naheliegend, als Ursache der Reduktionshemmung bei Hexobarbital einen durch die Substratmetabolisierung bedingten TPNH-Mangel anzunehmen. Das konnte durch Untersuchungen der *in vitro*-Wirkung in Homogenaten gesichert werden (Abbildung 8). Bei Ausschaltung der TPNH-Limitierung durch Zugabe von TPN, Glucose-6-Phosphat und G-6-P-Dehydrogenase wurde die Hemmung der Thyminreduktion in allen Dosisbereichen aufgehoben.

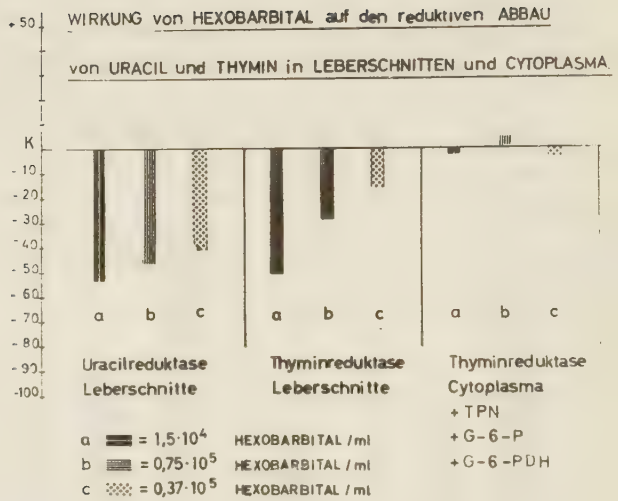


Abbildung 8

2) Thymin- und Uracilreduktion in Leberhomogenaten und Zytoplasma pharmakabehandelter Tiere

Die zur Analyse der in vitro- Wirkung von Hexobarbital ausgenützte Differenzierungsmöglichkeit durch vergleichende Untersuchungen von intaktem Gewebe und komplettierten Homogenat- und Zytoplasmaansätzen

wurden auch zur Klärung der Hemmungsmechanismen bei in vivo-Einwirkung von Phenobarbital angewandt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 und 10 dargestellt.

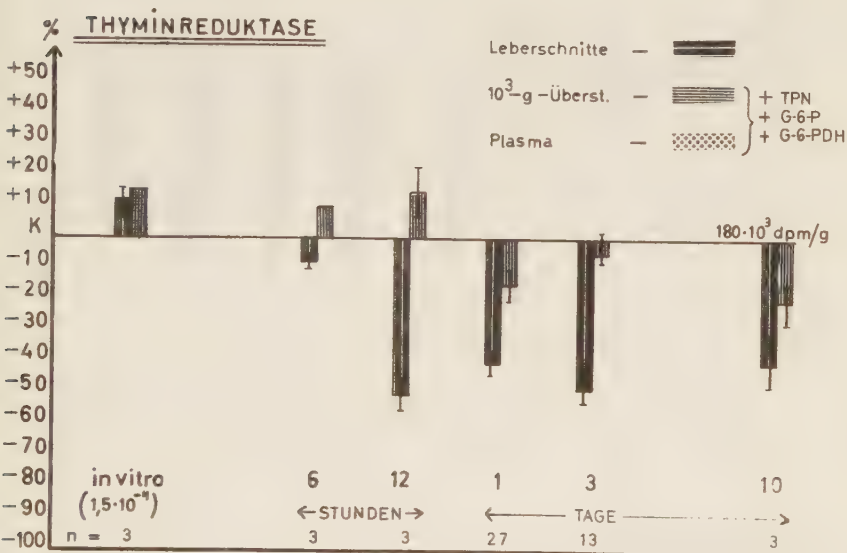


Abbildung 9

Die zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent der Kontrollwerte ausgedrückten Aktivitätsveränderungen zeigen, daß in den ersten Stunden bis zum ersten Tag eine deutliche Divergenz der Hemmungsgrößen besteht, so wie sie beim Hexobarbital beobachtet worden war. Während im Ganzgewebe die Aktivität der Uracilreduktase schon um 80% erniedrigt war, zeigte sich im komplottierten System eher sogar eine gesteigerte Aktivierung. Sie sank jedoch im weiteren Verlauf auf annä-

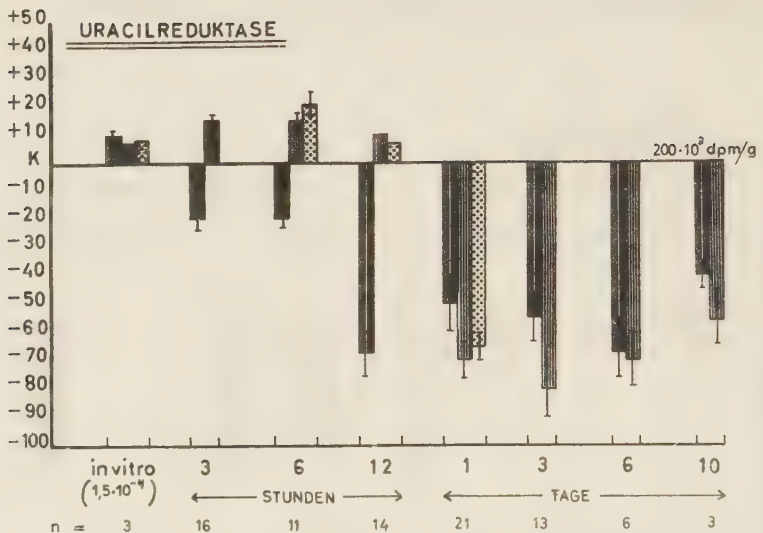


Abbildung 10

hernd die gleichen Prozentwerte wie im Ganzgewebe ab.

Die Hemmung der Uracilreduktion in dieser Phase beruht also sicher auf einer Verminderung der Enzymgehalte.

Bei der Untersuchung der Thyminreduktase fanden sich qualitativ ähnliche Verhältnisse. Die Fermentaktivität sank hier jedoch deutlich später, und zu keinem Zeitpunkt so ausgeprägt wie im intakten Gewebe.

3) Versuche zur Kinetik der Enzymhemmung

Eine Hemmung der Thymin- und Uracilreduktion durch Verminderung der Enzymgehalte muß einen anderen Verlauf der Dosiswirkungskurve ergeben als eine Hemmung durch Cofermentlimitierung. Im 1. Fall ist zu fordern, daß bei gleicher Michaeliskonstanten nur der Hemmung entsprechend erniedrigte Halbwert-

aktivitäten gefunden werden. Bei einer Cofermentlimitierung der Reaktion sind im Sättigungsbereich stärkere Aktivitätsherabsetzungen zu erwarten als im Halbsättigungsgebiet. Wir haben deshalb die Substratwirkungsverläufe für beide Reduktasen zunächst am ersten Tag der Phenobarbitalwirkung geprüft, zu einem Zeitpunkt also, an dem aus den vorausgegangenen Versuchen auf eine Cofermentlimitierung zu schließen war. Anschließend untersuchten wir dieselben Zusammenhänge am 5-6.Tag, an dem eine Herabsetzung der Enzymgehalte anzunehmen war. Der Verlauf der Kurven wird in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

Dosiswirkungsverlauf der Uracilreduktion

nach Phenobarbitalapplikation

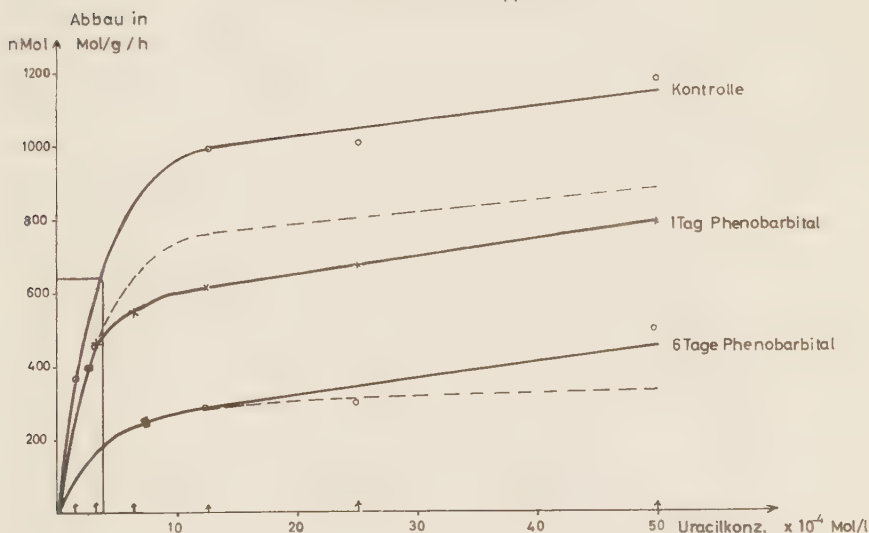


Abbildung 11

Der bei Verminderung der Enzymmenge theoretisch zu erwartende Verlauf ist schraffiert, die real gefundene Kurve ausgezogen dargestellt.

Die Abbildung der Dosiswirkungskurve der Uracilreduktase zeigt in Übereinstimmung mit den Homogenatversuchen, daß die Hemmung nach eintägiger Phenobarbitalapplikation vorwiegend auf einer Cofermentlimitierung beruht. Im Bereich hoher Substratkonzentrationen ist die Aktivität wesentlich stärker gehemmt als in den Substratbereichen unterhalb der Halbsättigung. Nach 6 Tagen liegt auch bei dieser Analyse eine Enzymherabsetzung vor.

Bei der Thyminreduktase ist die Divergenz der Verläufe weniger ausgeprägt. Reale und theoretisch errechnete Kurven sind hier annähernd identisch.

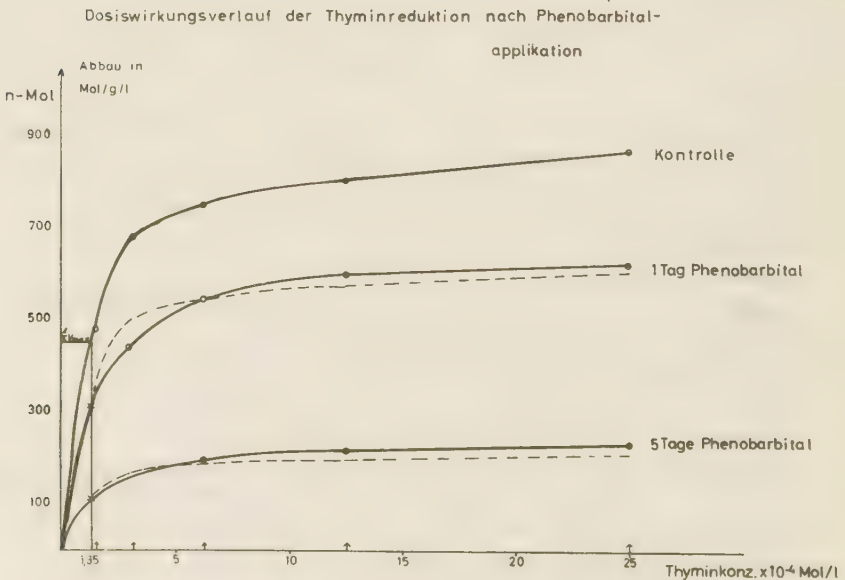


Abbildung 12

IV) Versuche zur zellphysiologischen Bedeutung der Thymin- und Uracilreduktasehemmung

Die hier durchgeführten Untersuchungen hatten das gesicherte Ergebnis erbracht, daß Pharmaka, die Leberwachstum auslösen, schon in sehr frühem Stadium den reduktiven Abbau von Thymin und Uracil hemmen. Die Parallelität zwischen Wachstumswirksamkeit eines Stoffes und Verlauf und Ausmaß der Hemmung, sowie die Dosiswirkungsbeziehungen dieser Meßgrößen lassen das Bestehen kausaler Zusammenhänge gesichert erscheinen. Offen blieb dabei die Frage nach dem primären Vorgang. Die möglichen Mechanismen einer Beziehung zwischen TPN- Redoxlage und Zellwachstum wurden von CANELLACIS et al. eingehend untersucht und auch größtenteils geklärt. Sie fanden, daß der verminderte Abbau von Thymin und Uracil durch Herabsetzung der Reduktasenaktivität von einer signifikant erhöhten Bildung der Ribotide, besonders der Triphosphatstufen beider Basen, gefolgt wird. Damit werden die stofflichen Voraussetzungen der Nucleinsäuresynthese geschaffen. Eine der Reduktasehemmung quantitativ entsprechende Erhöhung der Incorporation von markiertem Thymin und Uracil wurde in der teilhepatektomierten Leber experimentell gesichert.

Nachdem unsere Versuchsreihe eine vergleichbar starke Abbauehemmung der markierten Basen durch Pharmaka ergeben hatte, prüften wir, ob hier die gleichen Gesetzmäßigkeiten der Folgereaktionen wie in der teilhepatektomierten Leber bestehen. Von besonderem Interesse war dabei der Versuch, durch eine Analyse der zeitlichen Sequenz Hinweise auf den eigentlichen initialen Vorgang zu erhalten. Zur Beurteilung dieser Frage wurden bei dem stark wirksamen Phenobarbital und dem mittelstark wirkenden Barbitol, deren Effekt

auf das Leberwachstum hinsichtlich Ausmaßes, Dosisabhängigkeit und zeitlichem Verlauf in früheren Untersuchungen bereits exakt geklärt worden war (Dissertation RÄKER), folgende interessierende Größen, vergleichend mit dem Verlauf der Aktivität von Thymidin- und Uracilreduktase geprüft :

1. Die Relation der C1- und C6- Decarboxylierung spezifisch markierter Glucose als Maß des extramitochondrialen TPN-Umsatzes.
2. Die Synthese von Protein, freien Nucleotiden, Nucleinsäuren und Lipoiden durch chemische Analysen und durch die Bestimmung der Inkorporation markierter Vorstufen.
3. Die Aktivität der mikrosomalen TPNH-Oxydase.
4. Die Beeinflussung des TPN-Redoxstatus.

1) Die Beeinflussung des Glucose-6-Phosphat-shunts

Der extramitochondriale TPN-Umlauf wird nach früheren Untersuchungen durch chronische Applikation von Phenobarbital um ein mehrfaches gesteigert (Dis.BOSCH). Exakte Analysen des zeitlichen Verlaufs, auf die es bei unserer Fragestellung besonders ankam, wurden noch nicht durchgeführt. Wir prüften deshalb den Zeit-Wirkungsverlauf von der 6.Stunde bis zum 11.Tag der kontinuierlichen Phenobarbitaleinwirkung. Die Substanz wurde vom 1.Tag an mit dem Trinkwasser verabreicht, bei den Stundenversuchen zur Erzielung exakter Zeitverhältnisse subcutan injiziert. Der Verlauf ist in Abbildung 13, die statistische Beurteilung in Tabelle V-x dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der sehr unterschiedlichen Größen werden die prozentualen Abweichungen von den gleich 100% gesetzten Normalwerten angegeben. In allen Versuchen übereinstimmend war die Decarboxylierung von C1- und C6-markierter Glucose im intakten Gewebe wäh-

Wirkung von Phenobarbital auf den Glukoseabbau in Leberschnitten
und Homogenat

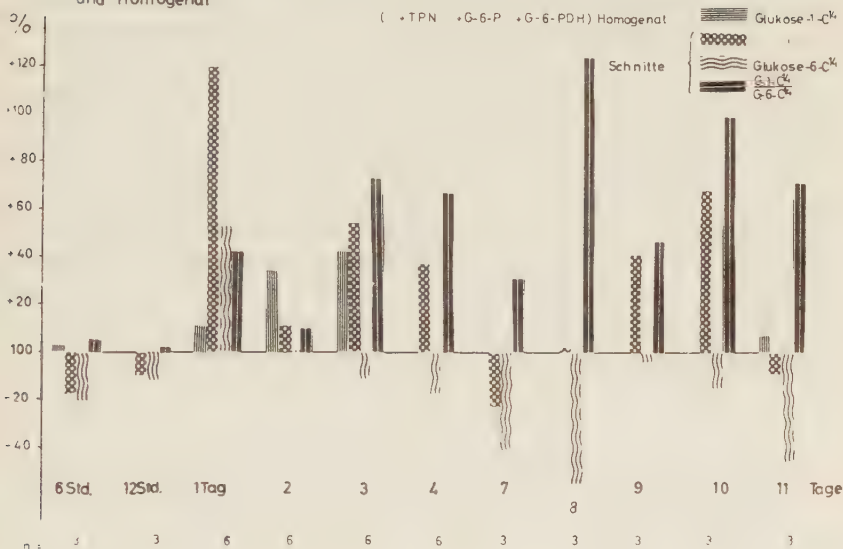


Abbildung 13

rend der ersten 6 und 12 Stunden nach Applikation gering erniedrigt. Nach einem Tag stiegen beide Größen ganz beträchtlich auf statistisch sicher erhöhte Werte an. Da die C₁-Decarboxylierung besonders intensiv betroffen war, vergrößerte sich die C₁/C₆-Relation, dem quantitativen Maß der Aktivität des Pentose-Phosphat-Shunts, um über 40%. Bei fortdauernder Applikation sinkt die Decarboxylierung C₆-markierter Glucose, die ja über den Citratzyklus erfolgt, kontinuierlich ab. Die C₁-Abspaltung, die eine Summe der über Citratzyklus und Pentose-Shunt erfolgenden Decarboxylierung darstellt, fällt ebenfalls, und zwar vorwiegend als Folge der stark verminderten Abnahme der Decarboxylierung im Zitronensäurezyklus, ab. Der Anteil der über den Pentose-Phosphat-Shunt dekarboxylierten C₁-Glucose bleibt durchweg erhöht. Die C₁/C₆ Relation besitzt dadurch

eine ansteigende Tendenz. Sie erreicht ihre höchsten Werte am Ende der ersten Applikationswoche, also etwa während des Höhepunktes des Leberwachstums. Bei fortdauernder Phenobarbitalgabe bildeten sich die extremen Veränderungen aller Größen wieder zurück und nähern sich bei Abschluß des Leberwachstums dem Normbereich.

Im Prinzip gleiche Verläufe der Glucosedecarboxylierung wurden auch bei anderen Wachstum induzierenden Pharmaka gefunden. Abbildung 14 gibt die prozentualen Veränderungen der den Pentose- Phosphat-Shunt kennzeichnenden C_1/C_6 - Relation wieder. In Tabelle VI-IX sind alle absoluten Meßgrößen dargestellt worden. Die Resultate lassen zusammenfassend eine der Wachstumswirkung analoge Abstufung erkennen.

Beinflussung des C_1/C_6 -Decarboxylierungsverhältnisses

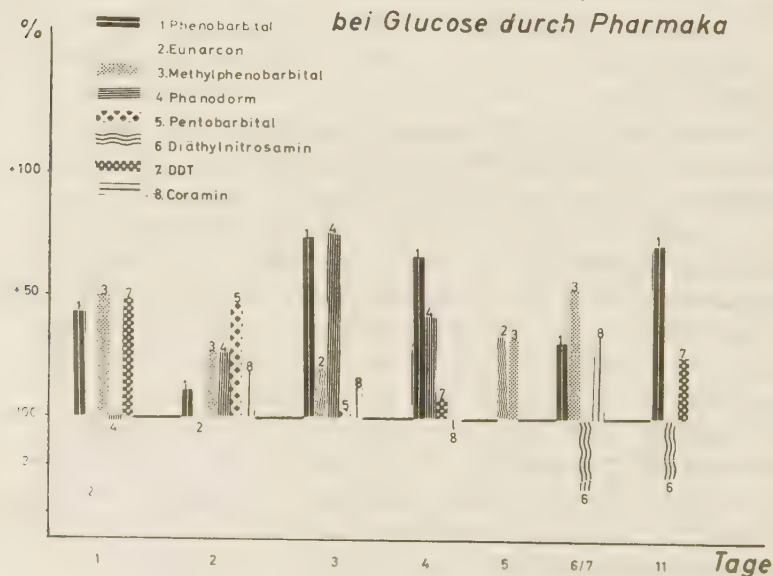


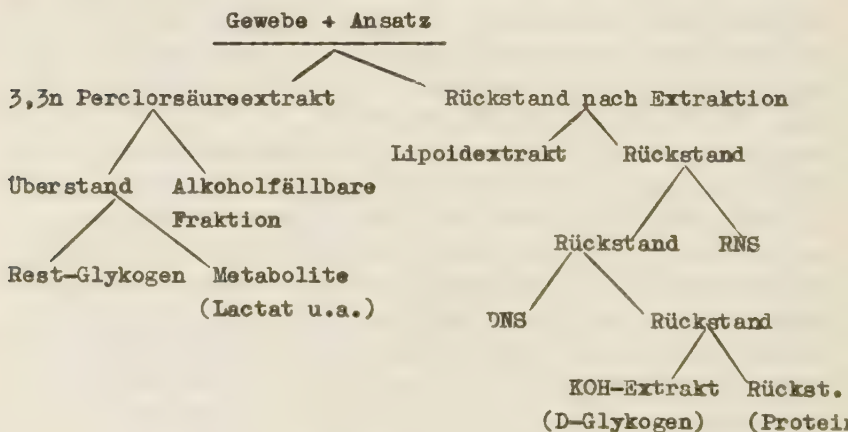
Abbildung 14

Methylphenobarbital entspricht in Verlauf und Ausmaß der Wirkung dem Phenobarbital. Bei den weniger die Leber vergrößernden Derivaten Eunarcon, Phanodorm und Pento-barbital setzt die Erhöhung des Pentose- Phosphat-Shunts später ein, und erreicht auch im Mittel die bei den Phenobarbitalen gefundenen Höchstwerte nicht. Eine ausgeprägte Aktivität findet sich ebenfalls bei dem Insektizid DDT. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Erhöhung des C_1/C_6 - Quotienten zu Wirkungsbeginn bei allen Derivaten wie beim Phenobarbital auf einer starken Erhöhung der C_1 - und einer schwächeren der C_6 - Decarboxylierung beruht. Beide Größen sinken dann meist unter weiterer Verschiebung der Relation kontinuierlich ab. In späteren Stadien finden sich dadurch regelmäßig bei gering erhöhten C_1 -Werten erniedrigte C_6 -Größen.

Um den extramitochondrialen TPN- Umsatz ohne Interferenz mitochondrialer Faktoren, wie z.B. des Citratzyklus oder TPNH verbrauchender Reaktionen des Fettsäurestoffwechsels verfolgen zu können, wurde vor allem in der interessierenden ersten Phase des Leberwachstums die C_1 - Decarboxylierung durch den 10.000g- Überstand in einem mit TPN, Glukose-6-Phosphat und G-6-P-Dehydrogenase komplettierten System beobachtet. Durch diese Komplettierung im Überschuss wird die Umsatzgeschwindigkeit ausschließlich durch die Aktivität der TPNH verbrauchenden Reaktionen von Zytoplasma und Mikrosomen limitiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 aufgenommen. Wie im intakten Gewebe läßt sich auch hier eine sichere Aktivierung nachweisen. Der Anstieg setzt jedoch später ein. Die Aktivität ist nach sechs Stunden noch unverändert, nach einem Tag nur leicht und dann ansteigend am zweiten und dritten Tag statistisch sicher erhöht. Nach Abschluss des Leberwachstums, geprüft wurde am 11.Tag und 4 Wochen nach chronischer Applikation, liegen die Werte auch hier wieder im Bereich der Norm.

2) C^{14} -Incorporation aus C_1 - und C_6 - markierter Glucose in Zellbausteine.

Für das bei allen Barbitursäure-Derivaten beobachtete kontinuierliche Absinken der C_6 -Größen von Glucose waren zwei Ursachen zu diskutieren. Es kam entweder eine Hemmung der oxydativen Decarboxylierung im Zitratzyklus durch diese Substanzen oder ein erhöhter Einbau von C_3 -Bruchstücken der Glucose bzw. des freigesetzten $C^{14}O_2$ in Betracht. Von einer experimentellen Prüfung waren nicht nur die Entscheidung dieser Frage, sondern darüber hinaus Aufschlüsse über Beginn und Umfang gesteigerter Stoffsynthesen von Zellbausteinen zu erwarten. Zur Orientierung, in welche Zellfraktionen unter unseren Versuchsbedingungen im Warburgapparat eine Incorporation von Glucose und Glucosebausteinen erfolgt, wurde das Gewebe nach dem folgenden Schema aufgearbeitet. Methodische Einzelheiten sind auf Seite 8 angegeben.



Über die Markierung der im Schema dargestellten Fraktionen gibt Tabelle 8 Auskunft.

Tabelle 8

A)	dpM/Ansatz	%
Eingesetzte Aktiv./Ansatz	1 110 000	100
Wiedergefund. " "	1 098 889	99,0
1) Restaktivität Glukose	1 074 122	96,8
2) C ¹⁴ O ₂	2 104	0,2
3) Alkoholfällung	13 848	1,2
4) Incorporierte Aktivität	8 814	0,8
Gesamtaktivität der Glucosemetabolite	24 766	2,2

B)	dpM/g	%
Gesamtaktivität der Glucosemetabolite	97 121	100
C ¹⁴ O ₂	19 102	19,6
Alkoholfällung	41 545	42,7
Lipide	15 862	16,3
davon Neutralfett	2 766	17,4
Phosphatide	13 096	82,6
RNS	7 739	7,9
DNS	4 227	4,3
Protein	8 646	8,9

Ins Gewicht fallende Aktivitäten finden sich demnach in der Alkoholfällung des Überstandes, die Lyoglykogen, lösliche Polynucleotide und einen Teil der freien Nucleotide umfasst, in der Lipoidfraktion und im Zellprotein. Die Aktivität von Nucleinsäuren und D-Glykogen war so gering, daß bei unseren Trennungsverfahren die Bedeutung unspezifi-

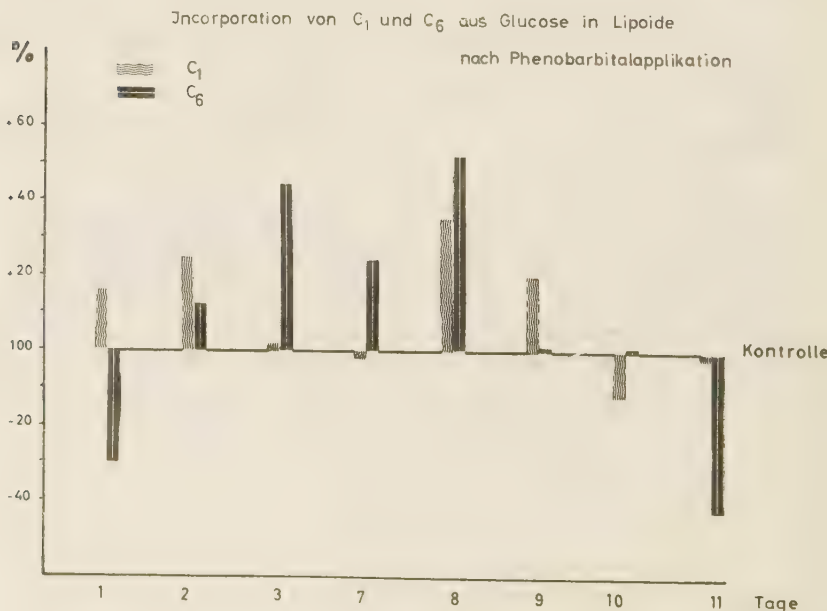
scher Beimengungen nicht auszuschließen war. Sie wurden deshalb nicht berücksichtigt.

a) Beeinflussung der alkoholfällbaren Fraktion

Die Aktivität der prozentual sehr stark markierten Fraktion, die durch Alkoholfällung des Perchlorsäureextraktes erhalten wurde, wurde durch Phenobarbital nur uneinheitlich beeinflusst. Es fanden sich ohne zeitliche Gesetzmäßigkeit sowohl erhöhte wie erniedrigte Einbauraten, wenn auch unter Phenobarbitaleinfluß die durchschnittliche C_6 -Incorporation um rund dreißig Prozent höher lag als bei den Kontrollwerten. Wegen der Inhomogenität dieser ersten Fraktion wurde die Klärung dieser Frage späteren Untersuchungen vorbehalten.

b) Incorporation in den Lipoidextrakt

Die Incorporation in die Lipoidlösliche Fraktion war im Vergleich zur alkohollöslichen bei den Normaltieren relativ konstant. Eine Steigerung der Einbaurate durch Pharmaka war hier sicher nachzuweisen. In Abbildung 15 wird



der Verlauf am Beispiel des Phenobarbital dargestellt. Tabelle 9 gibt die Veränderungen der Einbau-
raten durch weitere Pharmaka wieder.

Tabelle 9

Beeinflussung der Incorporation von Glukose-C in Lipide
durch verschiedene Pharmaka

Pharmaka	n	C ₁		C ₆	
		dpm/g	%	dpm/g	%
Kontrolle	11	29 273	100	29 481	100
Luminal	6	40 251	+ 30,0	42 106	+ 42,0
Eunarcon	5	43 885	+ 49,9	42 171	+ 43,0
Phanodorm	4	35 996	+ 22,9	36 155	+ 22,6
Pentobarb.	2	24 804	- 15,3	34 091	+ 15,6
Coramin	5	46 601	+ 59,1	58 471	+ 98,3
DDT	4	27 000	- 7,8	29 306	± 0
Diäthyl- nitrosamin	5	29 086	± 0	29 853	± 0
Tyrosin- Tryptophan	2	23 458	- 19,9	28 250	- 4,2
Biotin	2	28 408	- 3,0	29 162	± 0

Die durch Glucose markierbaren Lipide gehören nach ihren Löslichkeitseigenschaften zur Phosphatidfraktion. Die Steigerung des Einbaues beruht ebenfalls nicht auf erhöhter Neutralfettsynthese, sondern auf der vermehrten Incorporation in Phosphatide. Der Einbau von Glucose-6-C¹⁴ ist bei Berücksichtigung der erhöhten Decarboxylierung von C₁-Glucose erwartungsgemäß etwas stärker.

c) Incorporation in Protein

Nach Durchführung aller Extraktionsverfahren blieb in der Restfraktion, die im wesentlichen Protein enthält, eine geringe, aber sichere Aktivität zurück. Auch hier konnte

im Verlauf der Phenobarbitaleinwirkung eine in den ersten Tagen ansteigende, nach Abschluss der Wachstumsphase sich wieder zurückbildende Erhöhung der Einbaurrate gefunden werden (Abb. 16)

Inkorporation von C^{14} aus Glukose-1- C^{14} und Glukose-6- C^{14} in Protein

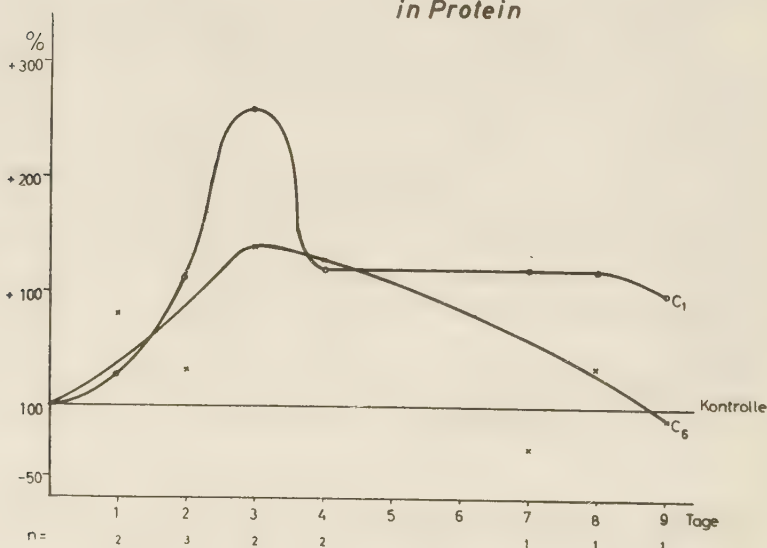


Abbildung 16

In drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen fand sich dabei interessanterweise eine stärkere Incorporation mit C_1 -Glucose. Diese noch durch weitere Untersuchungen zu sichernde Beobachtung kann nur dahingehend gedeutet werden, dass der Aktivitätsanstieg der Restfraktion nicht auf dem Einbau von Glucosemetaboliten, sondern auf erhöhter Incorporation von $C^{14}O_2$ beruht.

Diese Annahme ist angesichts der erhöhten Aktivität des Malic-Enzyms, dem eine wesentliche Bedeutung für die CO_2 -Fixierung zukommt, experimentell begründet. Den Einfluß anderer Pharmaka auf die Incorporation in Protein zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10

Incorporation in Protein unter Applikation verschiedener

Pharmaka	n	C ₁		C ₆	
		dpM/g	$\Delta\%$	dpM/g	$\Delta\%$
Kontrolle	9	4 406		5 392	
Eunarcon	4	5 653	+ 28,3	8 671	+ 60,8
Phanodorm	4	6 801	+ 54,3	10 730	+ 98,9
Pentobarbital	2	2 975	- 32,5	3 411	- 36,8
Coramin	5	5 139	+ 16,6	8 536	+ 58,3
DDT	4	4 161	- 5,6	5 384	0
Biotin	2	6 206	+ 40,0	5 861	+ 8,6
Diäthylni- trosamin	3	4 660	+ 5,7	5 983	+ 10,9

3) Incorporation von Thymin- und Uracil-2-C¹⁴

Weil die Analyse des Glukoseeinbaues in Zellbausteine keinen Hinweis auf Beginn und Verlauf von Nucleotid- und Nucleinsäuresynthesen erbracht hatte, wurden bei den Untersuchungen über den Thymin- und Uracilabbau die Einbauraten der nichtmetabolisierten Nucleinbasen nach dem gleichen Schema analysiert.

a) Die Incorporation in Nucleotide

Bei papierchromatographischer Auftrennung des Perchlorsäureüberstandes konnten in der Phase der stärksten Abbauehemmung von Thymin und Uracil vermehrt UV-absorbierende markierte Substanzen gefunden werden, deren RF-Werte im Bereich der Triphosphate lagen. Zur Identifizierung und zu

einer sicheren quantitativen Bestimmung waren die eingesetzten Aktivitäten jedoch zu gering. Für eine der Hemmung der Reduktasen parallel laufende Steigerung der Incorporation von Thymin und Uracil in ihre Nucleotide, wie sie von CANELLACIS nachgewiesen wurden, sprachen in unseren Versuchen weiterhin die erhöhten Aktivitäten der alkoholfällbaren Fraktion. Da hier eine Bedeutung des Lyoglykogens für die Aktivitätszunahme sicher auszuschließen ist, muss die Steigerung der Incorporation auf einer erhöhten Synthese von Nucleotiden bzw. säurelöslichen Polynucleotiden beruhen. Die Erhöhung ist bei beiden Basen deutlich, bei Uracil etwas stärker ausgeprägt. (Tabelle 11).

Tabelle 11

Alkoholfällbare Fraktion (Nucleotide bzw. säurelösliche Polynucleotide)

Pharmaka	Thymin		Uracil	
	dpM/g	$\Delta \%$	dpM/g	$\Delta \%$
Kontrolle (1)	9 944		15 766	
Luminal	12 772	+ 28,4	23 540	+ 49,3

Kontrolle (2)	21 697		17 405	
Barbital	20 625	- 5,0	21 683	+ 24,5

b) Einbau in Nucleinsäuren

Der Einbau von Thymin und Uracil in die RNS und DNS normaler Leberzellen war bei unseren Versuchen gering, aber regelmäßig nachweisbar. Bei den Lebern von mit Barbital behandelten Tieren waren die Incorporationsraten überwiegend erhöht. Der Einbau von Thymin in DNS war dabei regelmäßig

grösser als der von Uracil in RNS. Die höchsten Incorporationsraten wurden auch hier in der Phase des stärksten Leberwachstums gefunden.

Thymin-Uracileinbau in DNS und RNS

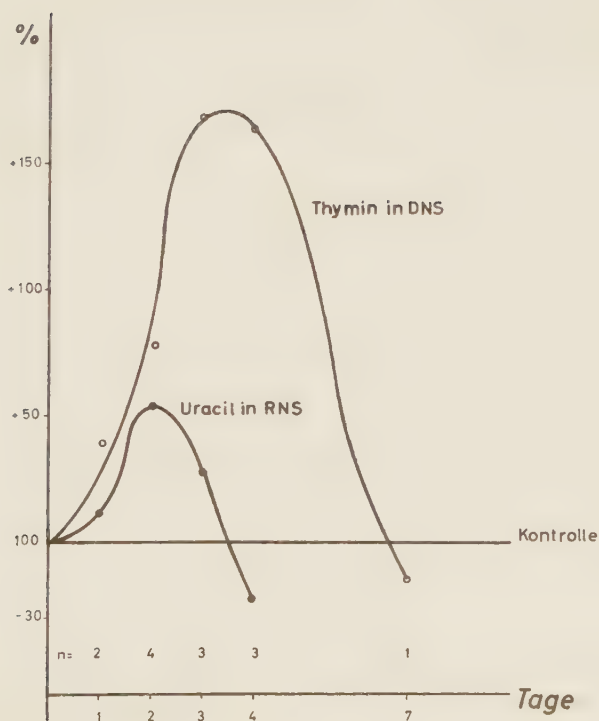


Abbildung 17

In Abbildung 17 ist der Verlauf der mittleren Steigerung der Einbauraten in unseren Versuchen mit allem Vorbehalt dargestellt. Auch hier sind, um die Realität dieser Verläufe zu sichern, weitere Untersuchungen unter Einsatz höherer Aktivitäten erforderlich. Vor allem der in sechs Versuchen übereinstimmend erhobene Befund, dass in den ersten drei Tagen der Barbitaleinwirkung ein erhöhter Thymineinbau in eine durch Ribonuclease spaltbare Nucleinsäurefraktion erfolgt, macht eine Überprüfung notwendig.

D) Diskussion

Die TPNH- abhängigen Thymin- und Uracil-Reduktasen der Leber sind nach Untersuchungen von CANELLACIS et al. wesentliche Glieder eines die Nucleinsäuresynthese der Zelle regulierenden Rückkoppelungsmechanismus. Eine Polymerisierung erfolgt in der Zelle nur, wenn alle Basen vorhanden sind (BOLUM, POTTER, MANTSAVINOS , CANELLACIS). Diese Voraussetzung ist für die Adenin-Cytidin- und Guanosinnucleotide immer gegeben. Thymidin-nucleotide sind in der Ruhezelle jedoch nicht nachweisbar, Uridinnucleotide nur in Konzentrationen von annähernd 10^{-4} Mol/l. Sie liegen überwiegend in Form der UDP-Substratverbindungen vor. CANELLACIS et al. nehmen daher an, dass es nur dann zur Bildung eines ausreichenden pools freier Uridin- und Thymidinnucleotide kommt, wenn die katabolen Enzyme dieser Basen voll mit Substrat gesättigt sind.

Unsere Grundlagenuntersuchungen zur Charakterisierung der Enzyme lassen diese Annahmen möglich erscheinen. Die aus methodischen Gründen bei intakten Zellen analysierten Substratwirkungsbeziehungen ergaben für beide Enzyme eine vergleichbar hohe Substrataffinität. Die Michaeliskonstanten liegen bei 10^{-4} Mol Substrat/l. Diese Werte stellen sicher Minimalgrößen dar. Es ist jedoch schon unter Zugrundelegung dieser minimalen Werte und der in den gleichen Versuchen ermittelten Enzymgehalte bei Uracil unwahrscheinlich und bei Thymin sicher auszuschliessen, dass die Substratkonzentration in der stationären Leberzelle diesen Bereich überschreiten.

Substratsättigung setzt demnach eine gesteigerte Basensynthese, herabgesetzte Enzymgehalte oder verminderte Enzymaktivität voraus. CANELLACIS et al.

wiesen nach, daß in der nach Teilhepatektomie wachsenden Leber die Enzymaktivitäten tatsächlich die ser Überlegung entsprechend stark erniedrigt sind. Sie fanden in der Regenerationsphase Aktivitätsminderungen beider Enzyme von 40-60%. Ob diesem Phänom eine Herabsetzung der Enzymmenge oder eine Limitierung der Umsatzgeschwindigkeit zu Grunde liegt, wurde nicht geprüft. An die zweite Möglichkeit läßt der rasche und gesetzmäßige Wechsel der Enzymaktivitäten mit dem Mitoserhythmus denken. Als Wirkungsprinzip einer dynamischen Aktivitätssteuerung erschien vor allem eine Limitierung durch das Coenzym denkbar. Für die Realität dieser Möglichkeit sprach der Befund, dass die TPNH-Gehalte in der regenerierenden Leber den Reduktaseaktivitäten parallel laufend erniedrigt sind. Einen weiteren Hinweis für dieser Hypothese stellte die Beobachtung dar, dass beide Reduktasen jahresrhythmische Aktivitätsschwankungen aufweisen, die gleichlaufenden Veränderungen der TPNH-Gehalte genau entsprechen. Einen sicheren Beweis für die Möglichkeit einer Aktivitätslimitierung durch das Coferment TPNH erbrachte der Befund, dass beide Enzyme in vitro durch Zugabe schnell metabolisierter Fremdstoffe wie Hexobarbital, die den mikrosomalen TPNH-Verbrauch experimentell nachweisbar erhöhen, in ihrer Aktivität dosisabhängig herabgesetzt werden. Eine direkte Enzyminhibition konnte bei diesen Experimenten sicher ausgeschlossen werden. Bei Untersuchungen im 10 000g-Überstand und Zytoplasma, das beide Reduktasen enthält, sowie mit grobgereinigten Enzympräparaten wurde die Fermentaktivität durch Hexobarbital auch bei höchster Dosierung nicht gehemmt. Das langsam metabolisierte Phenobarbital besaß unter gleichen Versuchsbedingungen in vitro nur geringe Wirkung. Die Hemmung der Reduktasen

geht in vitro also vollständig der Steigerung des extra-mitochondrialen TPNH-Umsatzes parallel.

Bei Applikation der Pharmaka in vitro wurde die gleiche Analogie der Wirkung gefunden. Entsprechend der Erhöhung des TPN- Umsatzes senkte Phenobarbital die Aktivität beider Reduktasen stark und nachhaltig, während Hexobarbital kaum wirksam war. Auch bei den übrigen Fremdstoffen liefen die Fähigkeit zur Wachstumsinduktion, die Steigerung des extramitochondrialen TPNH-Umsatzes und die Verminderung der Thymin- und Uracilreduktion hinsichtlich des Ausmaßes der Wirkung und des zeitlichen Verlaufs weitgehend parallel. Bei Anwendung verschiedener Phenobarbitaldosen bestand die gleiche Abstufung der Wirkungen. Das gleichsinnige Verhalten der Parameter bei diesen Versuchen sprach auch hier für die Deutung, dass die starke Beanspruchung des extramitochondrialen TPN-Systems durch die mikrosomalen Metabolisierungsenzyme eine unzureichende Coenzymbereitstellung für die zytoplasmatischen Pyrimidinreduktasen zur Folge hat. Bei diesen chronischen in vivo-Versuchen war jedoch daran zu denken, dass die Verminderung der Umsatzgrößen auch auf einer Herabsetzung der Enzymgehalte durch Synthesehemmung oder durch eine hinter dem Leberwachstum zurückbleibende Synthese beruht. Durch Untersuchungen im zellfreien komplettierten System konnte diese Möglichkeit für die frühen Stadien der Pharmakaeinwirkung sicher ausgeschlossen werden. Die hierbei gemessene absolute Aktivität der Uracilreduktase blieb bei Phenobarbitalapplikation während der ersten 24 Stunden noch im Normbereich, während sie im Gewebe schon nach 3 Stunden um 20%, nach 12 Stunden um über 50% erniedrigt war. Bei länger dauernder Applikation waren jedoch auch die absoluten Enzymaktivitäten annähernd gleich stark er-

niedrigt wie die Aktivität im intakten Gewebe. Bei der Thyminreduktase fand sich in der Frühphase die gleiche Divergenz von Enzymaktivität und Thyminreduktion durch Ganzgewebe. Hier sank jedoch auch im weiteren Verlauf die absolute Aktivität nur wenig unter die Normalwerte ab.

Die Analyse der Substratwirkungsbeziehungen bei diesen Versuchen erbrachte übereinstimmende Ergebnisse. Zu Beginn der Pharmakaeinwirkung wurden Aktivitätsverläufe gefunden, die für eine Reaktionslimitierung durch das Coenzym sprechen. In späteren Stadien waren die experimentell ermittelten Kurven mit den bei einer Verminderung der Enzymgehalte theoretisch zu erwartenden Verläufen identisch. Eine sichere Deutung dieser Resultate ist auf Grund unserer experimentellen Daten noch nicht möglich. Eine naheliegende Erklärung ist, dass es unter Pharmakaeinwirkung zunächst durch Coenzymmangel zu einer funktionellen Aktivitätsminderung kommt, die dann sekundär eine Abnahme der Enzymgehalte nach sich zieht. Das unterschiedliche Verhalten von Thymin- und Uracilreduktase könnte dabei auf einer verschiedenen Halbwertszeit der Enzyme beruhen. Diese Hypothese setzt voraus, dass für die Unduktion der Enzymsynthese nicht die Konzentration der Substrate Thymin und Uracil, sondern ein übergeordneter Regelmechanismus verantwortlich ist. Wenn die Bedeutung der beiden Pyrimidinreduktasen in der Anpassung der Thymin- und Uracilspiegel an den zellulären Bedarf besteht, so ist das jedoch eine notwendige Voraussetzung einer Regelfunktion. Die Realität dieser Vorstellungen muss in weiteren Versuchen geprüft werden. Wir haben in den abschließend durchgeführten Experimenten über die zellphysiologische Bedeutung der Reduktasen Ergebnisse erhalten, die sie möglich erscheinen lassen.

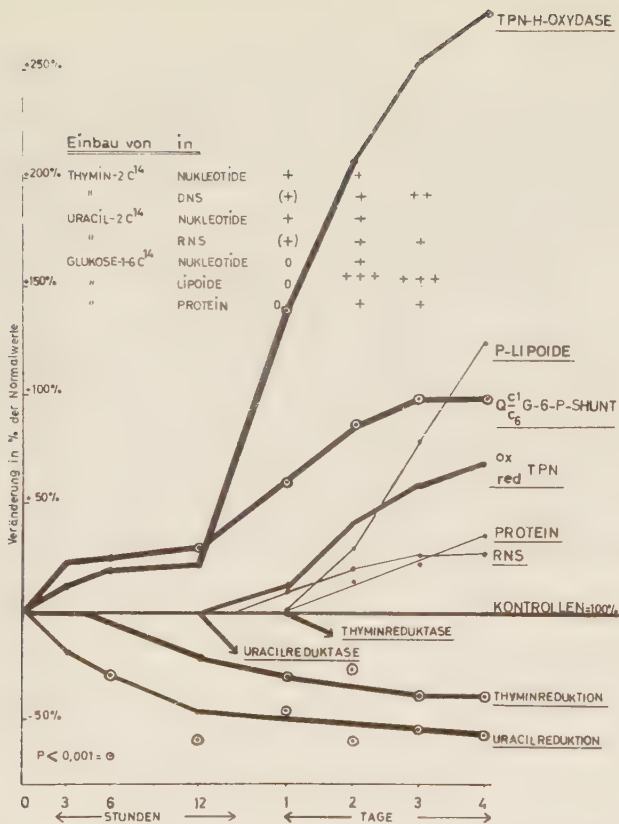


Abbildung 18

Abbildung 18 bringt in synoptischer Darstellung die Abnahme der Thymin- und Uracilreduktion, die Herabsetzung der Reduktaseaktivitäten, den Aktivitätsanstieg der TPNH-Oxydase, die Steigerung des G-6-P-shunts, die Veränderung der TPN- Redoxlage und das Einsetzen der Synthese der wesentlichen Zellbausteine. Die initial einsetzenden Wirkungen sind die Erhöhung des zytoplasmatischen TPN-Umsatzes, der Anstieg der TPNH-Oxydase und reziprog verlaufend das auf Coenzymmangel beruhende Absinken der Thymin- und Uracilreduktion. Eine sichere Veränderung dieser Meßgrößen kann schon im Verlauf der ersten 2 Stunden nachgewiesen werden. Sie laufen damit dem Einsetzen von Stoffsynthesen sicher voraus. Eine Incorporation markierter Vorstufen in freie Nucleotide, Pro-

tein, RNS, DNS und Lipide setzt in geringem Maße am 1.Tag ein. Sicher erhöhte Incorporationsraten finden sich erst vom 2.Tag ab. Sie kehren nach Erreichen eines Maximums an den folgenden Tagen nach Abschluss der Wachstumsphase wieder in den Bereich der Norm zurück. Mit chemischen Methoden läßt sich eine Zunahme von Protein, RNS, DNS und Lipiden erst vom 3.Tag ab nachweisen. Die Sequenz des Einsetzens der Veränderungen und die Wirkungsverläufe bilden zwar noch keinen sicheren Beweis für eine initiale Bedeutung der Pyrimidinreduktasen bei der Wachstumsinduktion und für eine vorge-schaltete Regelfunktion des TPN-Systems. Sie stehen jedoch damit so weitgehend in Einklang, dass es sicher berechtigt erscheint, diese Vorstellung als Arbeits-hypothese weiteren Untersuchungen zu Grunde zu legen.

Zusammenfassung.

1. Die TPNH-abhängigen Thymin- und Uracilreduktasen der Leber sind "kleine" Enzyme, deren Aktivitäten im Bereich der mikrosomalen TPNH-Oxydase und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase liegen. Sie sind ausschließlich im zytoplasmatischen Raum lokalisiert.

2. Bei Analysen in intakten Leberzellen unter Verwendung markierter Substrate wurde für die Thyminreduktase eine Michaelis-konstante von $1,35 \times 10^{-4}$ Mol/l und für die Uracilreduktase eine K_M von $3,8 \times 10^{-4}$ Mol/l gefunden. Bestimmungen im Zytoplasma unter optimalen Reaktionsbedingungen ergaben etwas höhere, aber in der gleichen Größenordnung liegende Konstanten. Die Umsatzgeschwindigkeit bei maximaler Substratsättigung betrug für Thymin 917, für Uracil 1282 nmol/Min./g F.g.

3. Das pH - Optimum beider Reduktasen liegt im Neutralbereich.

4. Die Aktivität der Enzyme zeigt ausgeprägte jahresrhythmische Schwankungen. Es besteht dabei eine deutliche Parallelität zu den jahresperiodischen Schwankungen der TPNH-Gehalte.

5. Bei in vitro-Zusatz kann die Aktivität beider Reduktasen durch Zugabe schnell metabolisierter Fremdstoffe, wie Hexobarbital, dosisabhängig gehemmt werden. Durch vergleichende Untersuchungen in Gewebe und Homogenaten, die mit einem TPNH-regenerierenden System komplettiert waren, konnte nachgewiesen werden, daß die Hemmung durch eine Konkurrenz um das Coenzym TPNH bedingt ist. Langsam metabolisierte Fremdstoffe, wie Phenobarbital, waren in vitro unwirksam.

6. Phenobarbital und andere Pharmaka, die Leberwachstum induzieren, senken die Reduktionsraten von Thymin und Uracil signifikant bei Applikation in vivo. In Leberschnitten beginnt die Hemmung schon etwa 2 Stunden nach den ersten Pharmakagaben.

Die Stärke der Wirkung entspricht ungefähr dem Effekt der Substanzen auf das Leberwachstum. Am stärksten wirksam waren Phenobarbital und Methylphenobarbital, es folgten Eunarcon und Cyclobarbital. Evipan, Nikethamid und Benzypren, die ohne Einfluß auf die Lebergröße sind, waren unwirksam.

7. Auch die lebervergrößernden Chlorkohlenwasserstoffe Aldrin, DDT und Halothan hemmen ihrer Wachstumswirksamkeit entsprechend den reduktiven Abbau beider Pyrimidinbasen. Das Insektizid Aldrin bewirkt eine über 80 prozentige Aktivitätshehmung.

8. Die Reduktionshemmung durch Pharmaka ist in gleicher Abstufung wie die Lebervergrößerung und die Pentosephosphatshunt-Aktivierung dosisabhängig.

9. In Homogenat und Cytoplasma war nach Komplettierung mit einem TPNH-regenerierenden System eine Hemmung durch Pharmaka nicht zu beobachten. Die initiale Reduktionshemmung beruht also auch hier auf Konkurrenz um das Coenzym. In späteren Stadien war auch die Aktivität der Enzyme erniedrigt. Diese Folgerung wurde durch kinetische Analysen bestätigt.

10. Die Hemmung des reduktiven Uracil- und Thyminabbaus durch Pharmaka fällt zeitlich zusammen mit dem Ansteigen der TPNE-Oxydase-Aktivität, der Steigerung des Pentosephosphatshuntes und der Positivierung der Redoxlage des cytoplasmatischen TPN-Systems. Stoffsynthesen in nachweisbarem Ausmaß folgen diesen Veränderungen zeitlich nach. Eine sichere Erhöhung der Inkorporationsrate von C^{14} -Glukose in Nukleinsäuren, Lipide und Protein, von C^{14} -Thymin in DNS und von C^{14} -Uracil in RNS wurde erst am 2. Tag der Pharmakaeinwirkung gefunden.

11. Die mögliche kausale Bedeutung der beobachteten initialen Wirkungen für das pharmakainduzierte Leberwachstum wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

- 1.) Bollum F.J. , Potter V.R. , J.Biol.Chem.
233,478 (1958)
- 2.) Bosch Diss. Die Beeinflussung der Pyridin-
nucleotid-Systeme der Leber durch die
Metabolisierung von Fremdstoffen und
ihre Beziehung zur Synthese von Zell-
lausteinen. Pharm.Inst. Marburg/L. 1966
- 3.) Canellakis E.S. , J.J. Jaffe,
R. Mantsavinos, J.S. Krakow J.Biol.Chem.
2096,234 (1959)
- 4.) Canellakis E.S. J.Biol.Chem.
227,701 (1957)
- 5.) Glock G.E. , P. Mc Lean Biochem.J.
61,395(1955)
- 6.) Holzer H. , Witt J. a) Biochem.Biophys.Acta
38,163 (1960)
b) Angewandte Chemie
70,439 (1958)
- 7.) Klingenberg L. , Th. Bücher Annual Review of Bio-
chemistry
29,669,(1960)
- 8.) Kunz W. Habil.schr. Marburg/L. 1963
Die Beeinflussung von Gehalt und Redoxlage
der Pyridinnucleotidsysteme in der Leber durch
die Metabolisierung von Fremdstoffen und ihre
zellphysiologische Bedeutung.
- 9.) Lineweaver u. Burk J.Am.Chem.Soc.
56,658(1934)
- 10.) Mantsavinos R. , Canellakis E.S. J.Biol. Chem.
234,628 (1959)
- 11.) Raker O. Diss. Die Beeinflussung des Leberwachstums
bei länger dauernder Applikation lipidlös-
licher Pharmaka. Pharm.Inst. Marburg 1966

Tabelle I

Zeitlicher Verlauf der Uracilreduktion in Leberschnitten

<u>Zeit</u>	<u>n</u>	<u>dpm/g</u>	<u>dpm/g/Minute</u>
10 Minuten	2	62534	6253
20 Minuten	2	88044	4402
35 Minuten	2	118399	3097
65 Minuten	2	159825	2412

Tabelle II

pH-Abhängigkeit der Thymin- und Uracilreduktion bei Pherobarbitalapplikation

		<u>pH 5,5</u>		<u>pH 7,4</u>		
		5 μ mol				
<u>1. Thyminreduktion</u>						
Kontrolle		369				
1. Tag		425	254			
2. "		448	250			
3. "		268	399			
			149			
				5		
				870	0,08	748 nmol C ¹⁴ O ₂ -Bildung
				619	601	546
				579		
				520		
<u>2. Uracilreduktion</u>						
Kontrolle						
1. Tag		319	289		1001	850
3. Tag		250	192		614	537
				1012		
				680		
				495		

Tabelle III

Dosiswirkungsverlauf der Thymin- und Uracilreduktion

		50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	$\times 10^{-4}$ mol/l
<u>1. Thyminreduktion</u>								
bei Leberschnitten								
Kontrolle		870,5	808,5	748,0	687	482		m. ol
1. Tag		619	601	546	439			"
5. "		236	216	198				"
<u>2. Uracilreduktion</u>								
bei Leberschnitten								
Kontrolle	1 187	1 012	1 001		460	371		"
1. Tag	796	680	614	537	464			"
6. "	502	299	284					
bei Homogenat								
Kontrolle			93,2		85,1	75,6		"

Beeinflussung des Thymin- und Uracilabbaues in Lebernomenat und Plasma
durch Phenobarbital (200 mg/kg/die) im 10 000g- Überstand

1. Thyminreduktion

Applikations- dauer	n	rel. Lebergew.	$\Delta\%$	dpm/g $C^{14}O_2$	δ_{in}	$\Delta\%$
Kontrolle	25	50,5		5 272	650	
6 Std.	3	53,6	+ 7,2	8 531	144	+61,8
12 "	3	55,5	+11,0	7 277	618	+38,0
1. Tag	6	60,2	+20,4	7 198	525	+36,5
2. "	3	62,4	+24,8	1 598	67	-69,7
3. "	3	64,0	+28,0	5 149	293	- 2,4
5. "	3	76,0	+52,0	2 244	175	-57,5
11. "	3	85,8	+71,6	1 781	227	-66,3

2. Uracilreduktion

Kontrolle	19	50,3		5 029	902	
6 Std.	3	54,4	+ 8,1	7 275	241	+44,6
1. Tag	3	57,4	+14,1	539	15	-89,3

Fortsetzung Tabelle IV

Applikations- dauer	n	rel. Lebergew.	$\angle$ %	dpm/g $C^{14}O_2$	δ_m	Δ %
2. Tag	3	68,5	+36,1	598	19	-88,2
3. "	3	62,1	+23,1	1 266	141	-74,9
4. "	3	67,9	+34,9	521	78	-89,7
11. "	3	69,6	+38,7	820	38	-83,7
<u>Plasma</u>						
Kontrolle 1	18	-		16 602		
6 Std.	6			27 373		+64,8
12 "	12	-		17 806		+ 7,2
Kontrolle 2	4	-		1 982		
24 Std.	6			611		-69,2

abelle V

Einflussung des Thymin- und Uracilabbaus in Leberschnitten
durch Zusatz der Pharmaka in vitro

Dosis	n	C ¹⁴ O ₂ -Bildung aus Thymin-2-C ¹⁴		C ¹⁴ O ₂ -Bildung aus Uracil-2-C ¹⁴	
<u>Kontrolle</u>	20	201	243	202	243
<u>I. Hexobarbital</u>					
150/ml	8	94	564 (-53%)	93	012 (-54%)
75 "	4	144	864 (-28%)	105	144 (-48%)
37,5 "	4	169	008 (-16%)	119	298 (-41%)
<u>II. Phenobarbital</u>					
100/ml	3			165	500
Kontrolle	3			149	366

Tabelle VI

Beeinflussung der Glukosedecarboxylierung durch Barbitale in Leberschnitten

Applikations- dauer	n	rel. Leber- gewicht	C ¹⁴ O ₂ -Bildung (dpm/g)				C ₆			
			C ₁		C ₆		C ₁		C ₆	
			dpm/g	γ	p	Δ %	dpm/g	γ	p	Δ %
Kontrolle	54	48,1	26 583	868			12 617	497	-	
<u>Zunarcon</u>										
1. Tag	3	47,9	21 325	2832	-	-19,8	14 175	176	0,005	+12,3
2. "	3	53,9	25 001	2701	-	- 6,0	13 108	1424	-	+ 3,8
3. "	6	63,9	39 398	2694	0,001	+48,2	15 367	821	0,008	+21,7
5. "	3	50,6	20 745	2166	0,02	-22,0	7 338	804	0,001	-41,9
<u>Prominal</u>										
1. Tag	3	58,2	33 509	2436	0,01	+26,0	10 665	512	0,01	-15,5
2. "	3	65,3	39 465	842	0,001	+48,4	14 838	1197	-	+17,6
5. "	3	54,9	33 722	1613	0,001	+26,8	12 044	366	-	- 4,6
6. "	6	65,1	32 561	1154	0,001	+22,4	10 200	837	0,02	-19,2
<u>Phenodorm</u>										
1. Tag	3	55,7	43 066	5522	0,005	+62,0	20 826	2059	0,001	+65,0
2. "	3	52,6	33 825	5434	-	+27,2	12 687	576	-	+0,5
3. "	3	58,9	39 796	2121	0,001	+49,7	10 732	1313	-	-15,0
4. "	3	58,6	25 625	684	-	- 3,7	8 593	889	0,001	-31,9
<u>Phenobarbital</u>										
1. Tag	3	52,9	26 526	1102	-	- 0,3	8 576	341	0,001	-32,0
3. "	3	63,2	30 844	3488	-	+16,0	14 260	4115	-	+13,0

Fortsetzung von Tabelle VI

Applikations- dauer	n	rel. Leber- gewicht	$C^{14}O_2$ -Bildung (dpm/g)									
			C_1					C_2				
			dpm/g	$\bar{C}$	p	$\Delta\%$	dpm/g	$\bar{C}$	p	$\Delta\%$		
Kontrolle	54	48,1	26 583	868			12 617	497				
<u>Phenobarbital</u>												
6 Stunden	3	41,0	22 052	3115	-	- 17,5	9 976	817	0,05	-21,0		
12 "	3	49,8	23 876	2361	-	- 10,2	11 111	900	-	-12,9		
1. Tag	6	67,2	58 325	2257	0,001	+119,4	19 429	934	0,001	+53,9		
2. "	6	71,0	29 511	4121	-	+ 11,0	12 639	1257	-	+ 0,1		
3. "	6	76,5	41 090	2888	0,001	+ 54,5	11 221	1925	-	-11,7		
4. "	6	86,3	36 472	3515	0,001	+ 37,2	10 392	1128	-	-17,7		
7. "	3	61,0	20 452	613	0,001	- 23,1	7 412	454	0,001	-41,3		
8. "	3	71,0	26 635	264	-	+ 0,1	5 631	256	0,001	-55,4		
9. "	3	81,0	37 657	687	0,001	+ 41,6	12 144	1842	-	- 3,8		
10. "	3	67,0	44 922	2822	0,001	+ 68,9	10 705	595	0,02	-15,2		
11. "	3	73,0	24 144	1442	-	- 9,2	6 666	115	0,001	-47,2		

Tabelle VII

Beeinflussung des Verhältnisses von C₁- zu C₆-Decarboxylierung

von Glukose durch Barbitale

Applikations- dauer	C ₁ /C ₆				C ₁ -C ₆	
	M	σ	p	Δ%	M	Δ%
Kontrolle	2,106	0,080		%	13 966	
<u>Eunarcon</u>						
1. Tag	1,504	0,168	0,002	- 28,6	7 150	- 48,8
2. "	2,102	0,035	-	- 0,2	13 108	- 6,2
3. "	2,550	0,162	0,01	+ 21,0	24 031	+ 72,0
5. "	2,827	0,198	0,002	+ 34,2	13 407	- 4,1
<u>Prominal</u>						
1. Tag	3,141	0,092	0,001	+ 49,1	22 844	+ 63,5
2. "	2,659	0,150	0,003	+ 26,2	24 627	+ 71,0
5. "	2,799	0,078	0,001	+ 32,9	21 678	+ 55,2
6. "	3,220	0,173	0,001	+ 52,8	22 361	+ 60,1
<u>Phanodorm</u>						
1. Tag	2,067	0,232	-	- 1,9	22 240	+ 59,2
2. "	2,666	0,316	-	+ 26,5	21 138	+ 51,3
3. "	3,708	0,266	0,001	+ 76,0	29 064	+108,8
4. "	2,983	0,274	0,002	+ 42,6	17 042	+ 22,0
<u>Pentobarbital</u>						
2. Tag	3,093	0,003	0,001	+ 46,8	17 950	+ 28,5
3. "	2,160	0,229	-	+ 2,5	16 584	+ 18,7
<u>Luminal</u>						
6 Stunden	2,209	0,142	-	+ 4,8	12 073	- 13,6
12 "	2,148	0,051	-	+ 1,9	12 765	- 8,6
1. Tag	3,010	0,155	0,001	+ 42,9	39 616	+183,6
2. "	2,335	0,110	-	+ 10,8	16 872	+ 20,8
3. "	3,661	0,079	0,001	+ 73,8	29 869	+113,8
4. "	3,509	0,077	0,001	+ 66,6	26 080	+ 86,7
7. "	2,759	0,088	0,001	+ 31,0	13 040	- 6,7
8. "	4,729	0,191	0,001	+124,5	21 004	+ 50,3
9. "	3,100	0,375	0,012	+ 47,2	25 513	+ 82,6
10. "	4,196	0,170	0,001	+ 99,2	34 217	+145,0
11. "	3,621	0,152	0,001	+ 71,9	17 478	+ 25,1

Applikations- dauer	n	rel. Leber- Gewicht	$C^{14}O_2$ - Bildung (dpm/g)		C_6	
			δ	$\Delta \%$	dpm/g	δ
Kontrolle	54	48,1	26 583	868	p	$\Delta \%$
DDT						
1. Tag	3	51,4	47 070	2712	0,001	+ 77,0
4. "	3	67,1	44 167	3214	0,001	+ 66,1
11. "	3	75,3	27 448	2158	-	+ 3,2
12. "	3	82,3	24 760	1921	-	- 6,9
Diäthyl- nitrosamin						
7. Tag	3	41,0	23 215	377	0,001	- 12,7
11. "	3	43,0	16 795	1498	0,001	- 36,9
5 Wochen	6	47,9	17 429	2370	0,001	- 34,5
3,5 Monate	6	48,9	25 288	2969	-	- 4,9
4 "	6	52,1	24 211	1335	-	- 9,0
Coramin						
2. Tag	3	51,7	23 895	686	0,02	- 10,2
3. "	3	64,4	26 257	2006	-	- 1,3
4. "	3	46,3	19 726	1299	0,001	- 25,8
7. "	3	45,6	17307	326	0,001	- 34,9
13. "	3	68,7	15 029	1026	0,001	- 43,5
Biotin						
3. Tag	3	55,1	74 169	888	0,001	+179,0
4. "	3	54,2	38 280	5892	-	+ 44,0
Thyrosin- Tryptophan						
1. Tag	3	58,9	27 170	3842	-	+ 2,2
2. "	3	63,1	24 661	1548	-	- 7,3

Die Werte in der Spalte $\Delta \%$ sind die prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Tabelle IX

Beeinflussung des Verhältnisses von C₁ - zu C₆ - Decarboxy-
lierung von Glukose durch verschiedene Pharmaka

Applikations- dauer	C ₁ /C ₆				C ₁ -C ₆	
	M	S	p	Δ %	L	Δ %
Kontrolle	2,106	0,080			13 966	
<u>DDT</u>						
1. Tag	3,131	0,223	0,001	+48,6	32 031	+129,3
4. "	2,296	0,039	0,03	+ 9,0	24 931	+ 78,5
11. "	2,672	0,115	0,001	+26,8	17 178	+ 22,0
12. "	3,143	0,619	0,05	+49,2	16 884	+ 20,8
<u>Diäthyl- nitrosamin</u>						
7. Tag	1,512	0,001	0,001	-28,3	7 867	- 43,7
11. "	1,619	0,095	0,001	-23,2	6 422	- 54,1
5 Wochen	1,409	0,002	0,001	-33,1	5 812	- 58,4
3,5 Monate	1,636	0,156	0,01	-22,4	10 006	- 28,4
4 "	2,239	0,061	-	+ 6,3	13 385	- 4,2
<u>Coramin</u>						
2. Tag	2,506	0,227	-	+18,9	14 361	+ 2,8
3. "	2,366	0,043	0,005	+12,3	15 161	+ 8,5
4. "	2,024	0,316	-	- 3,9	9 980	- 28,6
7. "	2,825	0,475	-	+34,1	11 182	- 20,0
13. "	2,210	0,389	-	+ 4,9	8 230	- 41,1
<u>Biotin</u>						
3. Tag	1,409	0,651	-	-33,1	21 553	+ 54,3
4. "	1,410	0,164	0,001	-33,1	11 145	- 20,2
<u>Tyrosin- Tryptophan</u>						
1. Tag	1,560	0,145	0,002	-26,0	9 755	- 30,2
2. "	1,807	0,072	0,001	-14,2	11 020	- 21,1

Tabelle X

Steigerung des Glukose-1-C¹⁴-Abbaus über den Pentose-Phosphat-Shunt in Homogenat

Zeit	n	(Plasma und Mikrosomen) durch Phenobarbital			p	Δ %
		C ¹⁴ O ₂ -Bildung (dpm/g)	M			
Kontrolle	18	55 438	1 327			
6 Stunden	3	57 356	1 454		-	+ 3,4
1 Tag	3	61 788	1 240		0,005	+ 11,4
2 Tage	3	74 454	2 763		0,001	+ 34,3
3 "	3	79 431	4 757		0,001	+ 43,2
11 "	3	59 333	6 264		-	+ 7,0
4 Wochen	3	66 302	932		0,001	+ 19,5

Tabelle XI

Glukoseincorporation in Lipide nach a) Phenobarbital-

b) Eunarcon- und c) Coraminapplikation

Applikations- dauer	C ₁		C ₆	
	dpM/g	Δ%	dpM/g	Δ%
<u>nach a) Phenobarbitalapplikation</u>				
<u>Kontrolle</u>	35 029		31 468	
2. Tag	43 833	+ 25,1	35 397	+ 12,4
3. "	35 326	+ 0,8	45 778	+ 45,4
7. "	34 552	- 1,4	39 144	+ 24,3
8. "	47 296	+ 35,0	48 108	+ 52,8
9. "	42 021	+ 19,9	31 740	+ 0,8
10. "	31 363	- 10,5	31 681	+ 0,6
<u>nach b) Eunarconapplikation</u>				
<u>Kontrolle</u>	29 273		29 482	
1. Tag	13 888	- 52,6	19 104	- 35,4
2. "	90 514	+209,2	94 567	+220,7
3. "	41 743	+ 42,5	37 800	+ 28,2
5. "	31 539	+ 7,7	21 578	- 26,9
<u>nach c) Coraminapplikation</u>				
<u>Kontrolle</u>	29 273		29 481	
2. Tag	24 125	- 17,6	38 925	+ 32,0
3. "	28 696	- 2,0	31 257	+ 6,0
4. "	112 817	+285,3	95 098	+222,5
7. "	21 604	- 26,2	22 780	- 22,8
13. "	45 767	+ 56,3	104 295	+253,7

Thymin- und Uracilincorporation in RNS und DNS

Barbital

		RNS		DNS	
		Thymineinbau	Uracileinbau	Thymineinbau	Uracileinbau
<u>1. Serie</u>					
Kontrolle	1	1 218	2 177	884	2 783
1. Tag	2	1 384	2 418	1 229	919
2. "	2	4 230	3 044	1 250	3 659
3. "	2	2 282	2 778	2 855	1 399
4. "	1	1 534	2 622	5 308	2 270
<u>2. Serie</u>					
Kontrolle	5	4 732	4 509	2 740	5 174
2. Tag	2	8 688	8 262	6 887	-
3. "	1	3 126	-	4 373	-
4. "	2	6 812	2 564	2 631	5 143
7. "	1	4 719	2 610	2 264	3 036
10. "	1	4 753	-	1 524	-
11. "	1	6 786	-	4 029	-

(dpm/g)

Mein Lebenslauf

Am 25.7.1939 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Albert Kirchberg und seiner Ehefrau Annemarie geb. Herzenskron in Erfurt geboren. Ich besuchte dort ab 1945 die Grund- und von 1953-57 die Heinrich-Mann-Oberschule, wo ich im Mai 1957 die Reifeprüfung bestand. An der Jugenddorf Christopherus-schule Oberurff legte ich im März 1958 eine Ergänzungsprüfung ab, und begann im Sommersemester 1958 in Marburg Medizin zu studieren. Nach kurzen Studienaufenthalten in Erlangen und Kiel kehrte ich nach Marburg zurück und bestand hier im Herbst 1964 das medizinische Staatsexamen. Anschließend war ich zehn Monate als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut Marburg tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten :

An der Universität Marburg

Bücher, Bock, Berendes, Braun-Falco, Dimroth, Exner, Förster, Gedigk, Gross, Hensel, Huber, Hamm, Hartmann, Hildebrandt, Hornung, Heuser, Jacob, Löhr, Linneweh, Lübbes, Mattes, Mahr, Meyer, du Mesnil, v.Mange-König, Marx, Niessing, Nieth, Pirson, Petry, Seidel, Schwaiger, Siess, Streicher, Siegert, Schmid, Schölmerich, Spiegelberg, Schrappe, Walcher, Waller, Würterle,

An der Universität Kiel

Alnor, Gärtner, Knothe, Leusden, Mollowitz, Pels, Rohleder, Reinwein, Philipp, Wanke,

An der Universität Erlangen

Bauer, Blümlein, Haug, Hackethal, Heim, Keidel, Knorr, Leonhardt, May, E.Müller, Ranke, Segschneider, Siebeck, Scheiffarth, Trinker, Weinland, Witte.



